

Aus dem Institut für Physiologie und Pathophysiologie  
– Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. Dr. Daut –  
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg



# **Die Rolle der L-Typ-Kalziumkanäle für die Schrittmacherfunktion in Locus coeruleus Neuronen der Maus**

Inauguraldissertation zur Erlangung des Doktorgrades der  
gesamten Humanmedizin dem Fachbereich Medizin der  
Philipps-Universität Marburg vorgelegt von  
Simon Schieber aus Karlsruhe

Marburg, 2012

Angenommen vom Fachbereich Medizin der  
Philipps-Universität Marburg am: 01.07.2013

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Prof. Dr. Matthias Rothmund

Referent: Prof. Dr. Niels Decher

1. Korreferent: Prof. Dr. Dr. h.c. Wolfgang H. Oertel

# Inhaltsverzeichnis

## 1

<b>Zusammenfassung</b>	<b>6</b>
1.1 Zusammenfassung . . . . .	6
1.2 Summary . . . . .	7

## 2

<b>Einleitung</b>	<b>9</b>
2.1 Morbus Parkinson . . . . .	9
2.1.1 Epidemiologie . . . . .	9
2.1.2 Symptomatik . . . . .	10
2.1.3 Ätiologie . . . . .	10
2.1.4 Therapie . . . . .	12
2.2 Locus coeruleus . . . . .	15
2.2.1 Anatomie des Locus coeruleus . . . . .	15
2.2.2 Funktion des Locus coeruleus . . . . .	17
2.2.3 Elektrophysiologische Eigenschaften der LC-Neurone . . . . .	18
2.2.4 Der Locus coeruleus und die Parkinson-Krankheit . . . . .	19
2.3 Spannungsabhängige Kalziumkanäle . . . . .	20
2.3.1 Einteilung und Lokalisation . . . . .	21
2.3.2 Molekularer Aufbau . . . . .	22
2.3.3 L-Typ-Kalziumkanäle . . . . .	24
2.4 Oxidativer Stress . . . . .	25
2.5 Ziele der Arbeit . . . . .	28

<b>3</b>		
	<b>Material und Methoden</b>	<b>29</b>
3.1	Elektrophysiologie . . . . .	29
3.1.1	Pharmaka . . . . .	29
3.1.2	Versuchstiere . . . . .	30
3.1.3	Präparation der Mäuse . . . . .	30
3.1.4	Elektrophysiologische Messungen . . . . .	31
3.1.5	Messlösungen . . . . .	33
3.1.6	Programme zur Datenanalyse . . . . .	33
3.1.7	Statistische Auswertungen . . . . .	33
3.2	Imaging . . . . .	34
3.2.1	Präparation des Gewebes . . . . .	34
3.2.2	Mikroskopie . . . . .	34
3.3	Molekularbiologie . . . . .	35
<b>4</b>		
	<b>Ergebnisse</b>	<b>37</b>
4.1	Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen von LC-Neuronen .	37
4.2	Molekularbiologische Charakterisierung des Expressionsmusters von Locus coeruleus Neuronen . . . . .	39
4.2.1	Enzyme der Katecholaminsynthese . . . . .	39
4.2.2	Kalziumkanal $Ca_v1.3$ . . . . .	40
4.3	„Pacemaking“ in Locus coeruleus Neuronen . . . . .	41
4.3.1	Schrittmacherfunktion . . . . .	41
4.3.2	Aktionspotentiale – Morphologie . . . . .	42
4.4	Effekt von Isradipin auf die Schrittmacherfunktion . . . . .	44
4.5	HCN-Kanäle spielen keine Rolle für das pacemaking im Locus coeruleus . . . . .	49
<b>5</b>		
	<b>Diskussion</b>	<b>52</b>
5.1	Identifizierung der LC-Neurone . . . . .	53
5.1.1	Anatomie . . . . .	53
5.1.2	Zellmorphologie . . . . .	54
5.1.3	Expression von Schlüsselenzymen . . . . .	55



5.1.4	Elektrophysiologisches Profil . . . . .	56
5.2	Vergleich Substantia nigra pars compacta und Locus coeruleus .	57
5.3	Kalziumhomöostase und Oxidativer Stress . . . . .	59
5.4	Neuroprotektion und klinischer Bezug . . . . .	61
<b>6</b>		
	<b>Anhang</b>	<b>64</b>
6.1	Verzeichnis der akademischen Lehrer . . . . .	64
6.2	Danksagung . . . . .	65
	<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>67</b>
	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>68</b>
	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>70</b>

# 1 Zusammenfassung

## 1.1 Zusammenfassung

Der Locus coeruleus (LC) ist aufgrund seiner bedeutenden Rolle in der Entstehung der Parkinson-Krankheit von großem wissenschaftlichen und therapeutischen Interesse. Im Verlauf der Erkrankung gehen dopaminerge Neurone der Substantia nigra pars compacta (SNpc) aus bisher ungeklärten Ursachen zugrunde. Noch bevor die SNpc betroffen ist, sind bereits degenerative Prozesse im Locus coeruleus nachweisbar. Die noradrenergen Neurone des LC haben protektiven Einfluss auf das Überleben der Substantia nigra und sind aus diesem Grund wichtiger Bestandteil der Forschung zur Parkinson-Krankheit.

Die Neurone des LC sind autonome Schrittmacherzellen. Der Mechanismus, der dieser Schrittmacheraktivität zugrunde liegt, ist bislang weitgehend ungeklärt. Ziel dieser Arbeit ist es, diesen Mechanismus genauer zu untersuchen und vor allem die Rolle der L-Typ-Kalziumkanäle zu klären. Hierfür wurden elektrophysiologische, molekularbiologische und fluoreszenzmikroskopische Experimente an Hirnschnitten von Wildtyp-Mäusen (C57Bl/6) durchgeführt. Mit der Patch-Clamp Technik gemessene Einzelzellableitungen haben ergeben, dass die alleinige Gabe des Kalziumantagonisten Isradipin keinen Einfluss auf das Entladungsmuster der LC-Neurone hat. Die Vermutung, die kontinuierlich generierten Aktionspotentiale beruhen auf regelmäßigen depolarisierenden Kalziumströmen, kann damit überraschenderweise widerlegt werden. Dennoch sind L-Typ-Kalziumkanäle in diesen Zellen aktiv: Nach Blockade der Aktionspotentiale durch Tetrodotoxin sind – ähnlich wie in SNpc-Neuronen – auch in Zellen des LC langsame Membranoszillationen („slow oscillatory potentials“) erkennbar, die durch Isradipin effektiv blockiert werden können. Kalziumströme sind

demnach an der elektrischen Aktivität der LC-Neurone beteiligt, für die autonome Generierung von Aktionspotentialen aber nicht essentiell.

Ein mögliches Modell zur Erklärung der erhöhten Vulnerabilität von SNpc- und LC-Neuronen bei der Parkinson-Krankheit macht durch intrazelluläres Kalzium verursachten oxidativen Stress für das verfrühte Zellsterben verantwortlich. Durch die Blockade der L-Typ-Kalziumkanäle in LC-Neuronen kann demnach entlastend auf den Kalziumhaushalt der Zellen Einfluss genommen werden, ohne die Funktion des Locus coeruleus grundsätzlich zu beeinträchtigen. Dieser Umstand macht den LC zu einem potentiell interessanten Wirkungsort für neue neuroprotektive Therapieansätze.

### 1.2 Summary

The Locus coeruleus (LC) is considered to play an important role in the pathogenesis of Parkinson's disease (PD) and therefore is of high scientific and therapeutic interest. In PD dopaminergic Substantia nigra pars compacta (SNpc) neurons degenerate for unknown reasons. Even before the SNpc is affected, there are degenerative processes demonstrable in the LC. Noradrenergic LC neurons are known to have neuroprotective influence on the Substantia nigra and promote survival of SNpc cells. Therefore the Locus coeruleus is an important scientific target for research in the field of Parkinson's disease.

Locus coeruleus neurons are autonomous pacemakers. Up to now, the mechanism underlying pacemaker activity is largely unknown. The aim of this study is to investigate this pacemaker mechanism more closely and to clarify the role of L-type calcium channels. Therefore, electrophysiological, molecularbiological and fluorescence microscopy experiments were performed on brain slices of C57BL/6 mice. Single cell patch clamp recordings showed, that applying the calciumchannel blocker isradipine alone has no influence on the firing pattern of LC neurons. In contrast to our initial expectation, our data show that autonomously generated actionpotentials do not rely on continuous depolarizing calcium currents.

However, L-type calcium channels are active in these cells. Blocking action potentials in LC neurons using tetrodotoxin reveals slow oscillatory potentials - similar to those in SNpc neurons - effectively blockable by isradipine. According to that, calcium currents contribute to the electrical activity of LC neurons without being essential for maintaining pacemaking.

Increased exposition to calcium-induced oxidative stress is thought to play a role in accelerated degeneration of cells within LC and SNpc in Parkinson's disease. Our study gives evidence that blocking L-type calcium channels in LC neurons may influence the calcium homeostasis and reduce calcium-mediated production of reactive oxygen species without affecting the physiological properties of the cells. We therefore assume that LC may be a promising target for next generation neuroprotective therapeutical approaches.

## **2 Einleitung**

### **2.1 Morbus Parkinson**

#### **2.1.1 Epidemiologie**

Die Parkinson-Krankheit (Morbus Parkinson, idiopathisches Parkinsonsyndrom) ist nach der Alzheimer-Demenz die zweithäufigste neurodegenerative Erkrankung. Die Prävalenz der Gesamtbevölkerung wird auf etwa 0,3 % geschätzt, bei über 60-Jährigen steigt sie auf etwa 1 % an (de Lau and Breteler, 2006). Diese Zahlen zeigen, dass Parkinson vorwiegend eine Erkrankung des älteren Menschen ist. Während die Erkrankung mit höherem Alter immer häufiger diagnostiziert wird, sind Diagnosestellungen vor dem 40. Lebensjahr hingegen eher selten. Die jährliche Inzidenzrate wird mit 8-18 pro 100000 Einwohner angegeben, wobei die Zahlen je nach untersuchter Population stark schwanken (de Lau and Breteler, 2006). Nach dem 60. Lebensjahr steigt die Inzidenz stark an.

In der Bevölkerungsstruktur industrialisierter Staaten ist in den letzten Jahrzehnten eine deutliche Tendenz in Richtung einer immer älter werdenden Gesellschaft zu erkennen (Statistisches Bundesamt, 2009). Es wird angenommen, dass sich diese Entwicklung auch in der nächsten Zeit fortsetzt. Dies hat zur Folge, dass die Prävalenz von neurodegenerativen Erkrankungen in Zukunft noch stärker ansteigen wird, was die Entwicklung von neuroprotektiven Therapieansätzen bzw. präventiven Strategien umso bedeutender macht.

### 2.1.2 Symptomatik

Die motorischen Kardinalsymptome der Parkinson-Krankheit sind eine Tonuserhöhung der Willkürmuskulatur (Rigor), ein meist asymmetrisch beginnendes Zittern der Extremitäten in Ruhe (Ruhetremor) und eine allgemeine Verarmung der Motorik (Akinese), wobei ein Tremor nicht immer beobachtet wird und somit kein obligatorisches Kriterium zur Diagnosestellung darstellt. Neben den motorischen Manifestationen leiden Parkinson-Patienten meist unter verschiedenen Begleitsymptomen wie autonomen Dysfunktionen, Schlafstörungen, psychiatrischen Störungen, gastrointestinalen Dysfunktionen oder sensiblen Symptomen.

Der Verlauf der Erkrankung ist langsam, meist über Jahre bis Jahrzehnte progredient; bisher ist es nicht möglich, das Fortschreiten der Erkrankung zu verhindern oder zu verzögern. Es existiert derzeit lediglich eine symptomatische Therapie.

### 2.1.3 Ätiologie

Die motorischen Symptome der Parkinson-Krankheit sind hauptsächlich auf ein Absterben der dopaminergen Neurone der Substantia nigra pars compacta (SNpc) zurückzuführen. Durch den sinkenden Dopaminspiegel in den Zielstrukturen der Substantia nigra, wie dem Striatum, kommt es dort zu einem Ungleichgewicht der Neurotransmitter Dopamin, Glutamat und GABA, was dazu führt, dass vom Striatum aus die bewegungshemmenden Impulse überwiegen. Eine Verarmung der Willkürbewegungen (Akinese) ist die Folge.

Die Ursache für das verfrühte Zellsterben ist trotz jahrzehntelanger Forschung bisher noch nicht hinreichend verstanden. Nach dem gegenwärtigen Stand der Erkenntnis ist ein Zusammenwirken mehrerer Faktoren wahrscheinlich. Genetische Faktoren spielen zwar eine Rolle, monogenetisch vererbte, familiäre Formen der Parkinson-Krankheit sind insgesamt jedoch eher selten. Histopathologisch finden sich in den betroffenen Neuronen intrazelluläre Proteinag-

gregate, die sogenannten Lewy-Körperchen. Diese bestehen hauptsächlich aus Ansammlungen von fehlgefaltetem  $\alpha$ -Synuclein und Ubiquitin. Die Proteinablagerungen wirken toxisch auf die Zellen. Ebenfalls toxisch auf Neurone der SNpc wirken verschiedene Gifte, wie z.B. MPTP (1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridin), aber auch Kohlenmonoxid oder Mangan. Daneben haben eine Reihe von Medikamenten einen anti-dopaminergen Effekt und können somit einen sekundären Parkinsonismus auslösen.

Als größter Risikofaktor für die Entwicklung der Parkinson-Krankheit gilt jedoch das Alter; die oben beschriebenen epidemiologischen Daten illustrieren dies. Ein Grund für das vorzeitige Altern der betroffenen Zellen könnte deren erhöhte Exposition gegenüber oxidativem Stress sein. In Abschnitt 2.4 wird ein möglicher Erklärungsansatz, aus welchem Grund gerade die Neurone, die im Verlauf der Parkinson-Krankheit zugrunde gehen, in besonders hohem Maße oxidativem Stress ausgesetzt sind, vorgestellt.

Nach Braak et al. (2004) können die pathologischen Veränderungen im Verlauf der Parkinson-Krankheit in sechs Stadien eingeteilt werden. So sind beim Fortschreiten der Erkrankung nicht nur Neurone der SNpc vom beschleunigten Zelltod betroffen, sondern zusätzlich eine Reihe anderer Kerne in verschiedenen Anteilen des Gehirns.

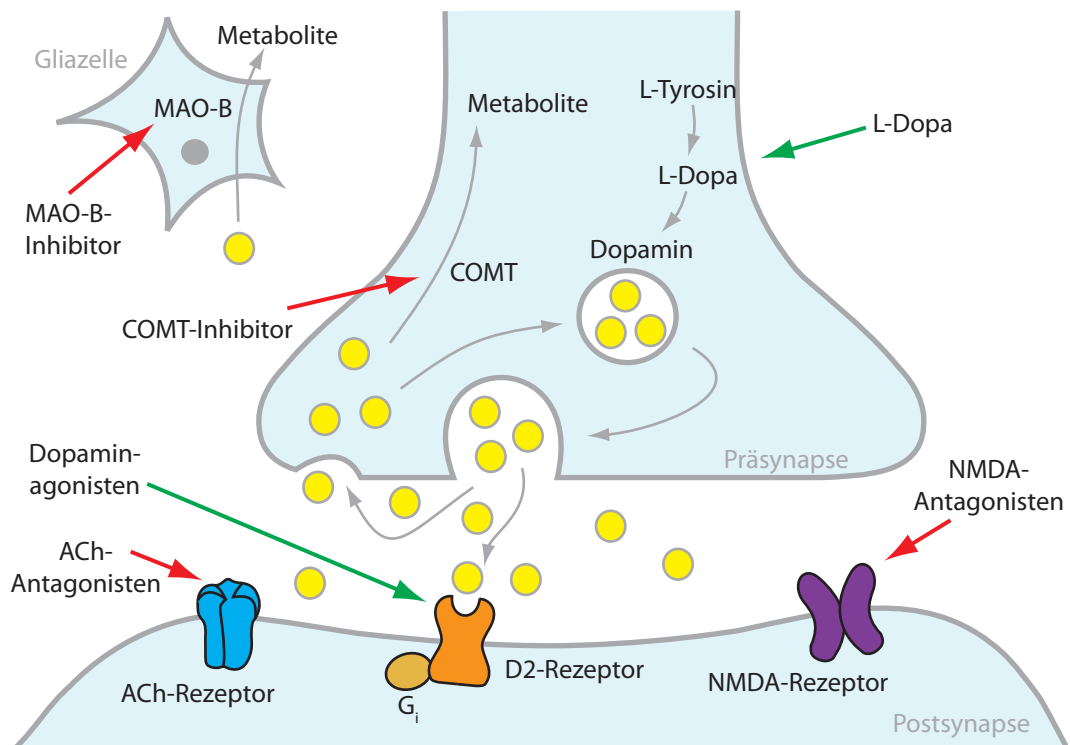
In den Stadien I und II befindet sich der Patient noch in der klinisch präsymptomatischen Phase. Hier sind vor allem Bereiche des olfaktorischen Systems und autonome Kerngebiete der *Formatio reticularis* in der *Medulla oblongata* (Ncl. dorsalis n. vagi, Raphe-Kerne) betroffen. In Stadium II treten außerdem erste pathologische Veränderungen im *Locus coeruleus* auf. Die *Substantia nigra* ist – neben der *Amygdala* – erst in Stadium III von degenerativen Prozessen betroffen und markiert damit die Schwelle zur symptomatischen Phase der Erkrankung. Erste kortikale Veränderungen zeigen sich in Stadium IV, die Gedächtnisstörungen zur Folge haben. In den beiden letzten Stadien V und VI ist nahezu der gesamte *Neocortex* mitbetroffen, außerdem machen sich Zellschäden in Regionen, die schon in der präklinischen Phase ihren Ursprung haben, hier deutlicher bemerkbar (Braak et al., 2004).

#### 2.1.4 Therapie

Wie oben angedeutet ist bislang keine kausale Therapie der Parkinson-Krankheit bekannt. Bei Manifestation der ersten motorischen Symptome sind bereits ca. 70 % der SNpc-Neurone abgestorben. Dies deutet auf eine hohe Kompensationsfähigkeit der verbliebenen Zellen hin. Prinzipiell beginnt die symptomatische Behandlung immer pharmakologisch. Hierfür stehen neben dem Dopaminvorläufer Levodopa (L-Dopa) auch Dopaminagonisten (Pramipexol, Ropirinol, Cabergilin u.a.), NMDA-Rezeptor-Antagonisten (Amantadin), Antagonisten der Monoaminoxidase ( $\text{MAO}_B$ -Hemmer), Anticholinergika (Biperiden) und Hemmer der Catechol-O-Methyl-Transferase (COMT-Hemmer; Entacapon) zur Verfügung. In Abbildung 2.1 sind die Wirkungsorte dieser Medikamente schematisch dargestellt.

In der Frühphase der Erkrankung wird versucht, vor allem mithilfe von Dopaminagonisten den Einsatz von L-Dopa hinauszuzögern, da mit längerer Behandlungsdauer die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten von L-Dopa-assoziierten Nebenwirkungen wie Dyskinesien, Wirkungsfluktuationen und akinetischen Krisen erheblich steigt und dadurch letztendlich die Behandlung komplexer wird.





**Abbildung 2.1: Überblick über die medikamentöse Therapie bei der Parkinson-Krankheit.** Dargestellt sind die jeweiligen Wirkungsorte der verschiedenen Pharmaka. Über die Gabe von L-Dopa kann die effektive Dopamin-konzentration an der Synapse direkt erhöht werden. Ein zusätzlich verabreichter Decarboxylase-Inhibitor verhindert die Umwandlung zu Dopamin außerhalb des ZNS. Dopaminagonisten greifen direkt am Dopaminrezeptor an und simulieren die Wirkung von Dopamin. Der Abbau von Dopamin kann durch COMT- und MAO-B-Inhibitoren gehemmt werden. Anticholinergika hemmen exzitatorische cholinerge Neurone, um den relativen Überschuss an Acetylcholin auszugleichen. Analog reduzieren NMDA-Antagonisten den relativen Überschuss an Glutamat.

Im fortgeschrittenen Krankheitsstadium prägen vor allem Medikamentennebenwirkungen und Komplikationen das klinische Bild. Immer höhere L-Dopa-Dosen sind erforderlich, um sog. „Off“-Phasen, das heißt Phasen mit sehr schlechter Beweglichkeit, zu behandeln. Mit jeder Dosiserhöhung steigt das Risiko für Wirkungsfluktuationen und andere Nebenwirkungen. Für Patienten, bei denen die medikamentösen Therapieoptionen ausgeschöpft sind, kommt ein neurochirurgischer, stereotaktischer Eingriff in Betracht. Gute Ergebnisse werden mit der tiefen Hirnstimulation („deep brain stimulation“, DBS) er-

reicht. Bei diesem Behandlungsverfahren wird chirurgisch eine Elektrode nahe dem Nucleus subthalamicus (STN) implantiert und dieser durch hochfrequente Stimulation funktionell ausgeschaltet. Der bewegungshemmende Einfluss des STN wird dadurch aufgehoben, sodass es zu einer Verbesserung der Beweglichkeit kommt. Einige Studien legen auch einen positiven Einfluss der DBS auf nicht-motorische Symptome nahe (Fasano et al., 2012).

Von großer Bedeutung in der Behandlung Parkinson-Erkrankter ist zudem eine regelmäßige Krankengymnastik mit Gehtraining, um die verbliebene Mobilität zu stabilisieren und zu erhalten. Im Krankheitsverlauf häufig auftretende, medikamenteninduzierte Psychosen werden mit atypischen Neuroleptika wie Clozapin therapiert. Mithilfe von Logopädie kann versucht werden, Sprech- und Schluckstörungen zu behandeln.

Die symptomatische Behandlung von Parkinson-Syndromen hat in der jüngsten Vergangenheit große Fortschritte gemacht, sodass Betroffene häufig noch einige Jahre nach der Diagnosestellung relativ symptomarm leben können. Der fortschreitende Zellverlust von SNpc-Neuronen kann dadurch aber nicht verlangsamt werden. Von großer Bedeutung ist deshalb die Entwicklung von neuroprotektiven Strategien in Verbindung mit geeigneten Früherkennungsmaßnahmen, um die Krankheit optimalerweise in ihrer präsymptomatischen Phase diagnostizieren und den Progress aufhalten zu können.

Wie bereits beschrieben zielt die gegenwärtig verfügbare medikamentöse Therapie lediglich auf die Reduktion der mit der Parkinson-Krankheit einhergehenden Symptome ab. Da zu diesem Zeitpunkt bereits ein Großteil der dopaminergen Zellen abgestorben ist, sind neue therapeutische Ziele und Maßnahmen wünschenswert, die in einem früheren Erkrankungsstadium greifen. In diesem Kontext rückt neben der Substantia nigra auch der Locus coeruleus in den Fokus der Wissenschaft.

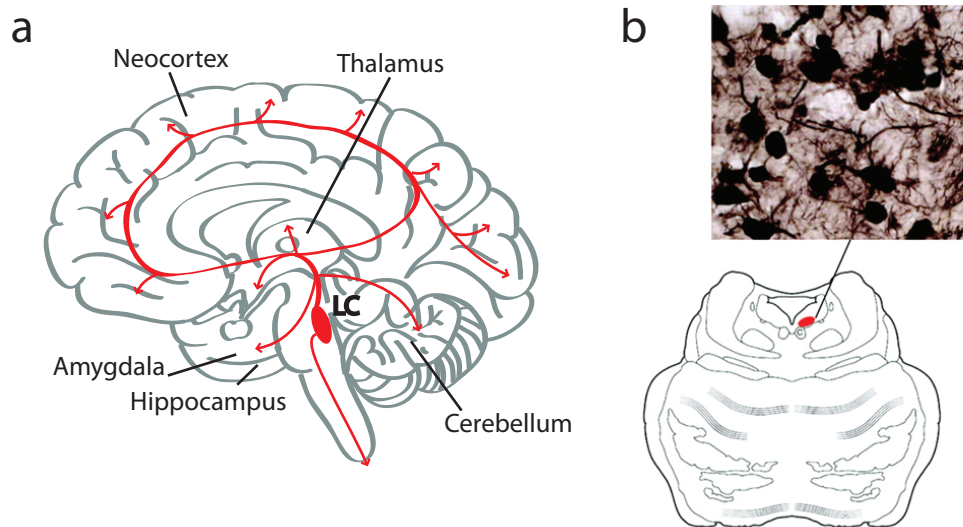
## 2.2 Locus coeruleus

### 2.2.1 Anatomie des Locus coeruleus

Der Locus coeruleus (LC) des Menschen ist ein bilateral symmetrisch angelegter Kern im oberen Teil des dorsolateralen Pons. Der Kern liegt etwa 1 mm vom Boden des vierten Ventrikels entfernt. Die räumliche Ausdehnung des LC ist dünner und länglicher als bisher angenommen, wie eine aktuelle anatomische Studie zeigt (Fernandes et al., 2012). Der menschliche LC verläuft diesen Untersuchungen zufolge nahezu senkrecht durch den Pons und ist im Durchschnitt 14,5 mm lang und 2-2,5 mm dick. Die Anzahl der LC-Neurone im humanen Hirnstamm beträgt ca. 10000 bis 15000 (Berridge and Waterhouse, 2003).

Der LC ist die Hauptquelle für Noradrenalin im gesamten Gehirn. Diese noradrenergen Neurone besitzen eine ausgeprägte dendritische Verzweigung, sodass die Projektionen einer einzelnen Zelle den Großteil des menschlichen ZNS erreichen können. Die efferenten Fasern erreichen Kortex, Amygdala, Hippocampus, Septum, Cerebellum, Thalamus, Hypothalamus und Rückenmark (Berridge and Waterhouse, 2003; Benarroch, 2009). Bemerkenswerterweise besteht keine efferente Verbindung zu den Basalganglien (Nucleus caudatus, Putamen, Pallidum). Es konnten jedoch Efferenzen in die Substantia nigra (Collingridge et al., 1979), den Nucleus subthalamicus (Rinvik, E. and Hammond, C. and Deniau, J. M. and Feger, 1979) und in die VTA (Jones and Moore, 1977) nachgewiesen werden. Abbildung 2.2, a zeigt schematisch die Projektionen des LC.

Regulatorische Einflüsse auf die Aktivität des Locus coeruleus kommen von sehr unterschiedlichen Hirnregionen. Aston-Jones und Kollegen gingen ursprünglich davon aus, dass die Neurone des LC lediglich von zwei Kernen Afferenzen erhalten: vom Nucleus paragigantocellularis (Glutamat, exzitatorisch) und vom Nucleus praepositus hypoglossi (GABA, inhibitorisch) (Aston-Jones et al., 1986; Ennis and Aston-Jones, 1989). Eine Reihe anderer Untersuchungen



**Abbildung 2.2: Efferenzen des Locus coeruleus.** **a:** Der LC liegt im oberen Teil des dorsolateralen Pons. Seine Zellen haben eine sehr ausgeprägte dendritische Verzweigung und projizieren in nahezu das gesamte Zentrale Nervensystem. Sie stellen die wichtigste Quelle für Noradrenalin im menschlichen Gehirn dar. **b:** LC-Neurone können anhand von immunhistochemischen Färbungen für Tyrosinhydroxylase (TH) identifiziert werden. TH ist das geschwindigkeitsbestimmende Enzym in der Noradrenalinsynthese (modifiziert nach Benarroch (2009)).

zeigte jedoch, dass die Zellfortsätze der LC-Neurone Ziel vieler Projektionen aus präfrontalem Kortex, Amygdala, Hypothalamus und Formatio reticularis darstellen, wobei der präfrontale Kortex den stärksten modulatorischen Einfluss hat (Berridge and Waterhouse, 2003; Arnsten and Goldman-Rakic, 1984). Außerdem wurden Orexin-enthaltende Neurone im lateralen Hypothalamus identifiziert, die in den LC projizieren (Peyron et al., 1998). Diese Zellen wirken aktivitätssteigernd auf LC-Neurone.

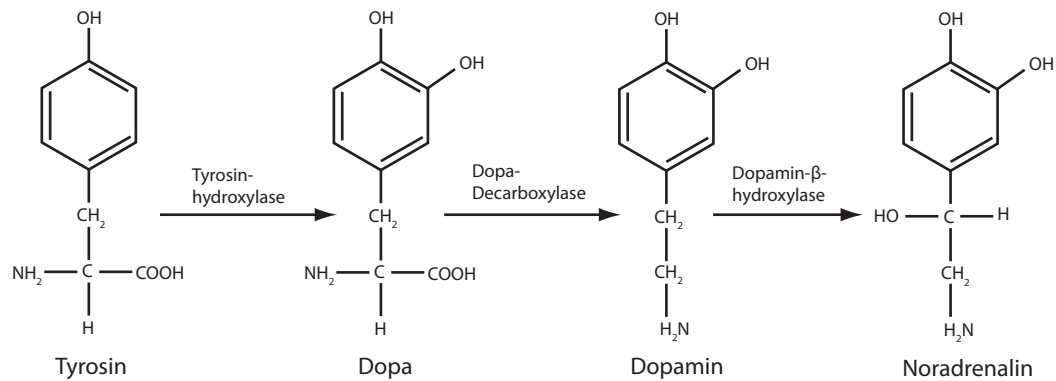
### 2.2.2 Funktion des Locus coeruleus

Der LC hat eine Vielzahl verschiedener Funktionen. Wie oben beschrieben sind die Zellfortsätze der LC-Neurone überaus weitläufig verzweigt. Diese diffusen Projektionen in das gesamte Gehirn geben einen Hinweis darauf, dass die Zellen des LC weniger die Aufgabe haben, konkrete Informationen, wie zum Beispiel motorische Befehle oder Sinneseindrücke, weiterzugeben, sondern vielmehr modulatorische und regulatorische Effekte haben. LC-Zellen werden vor allem durch neue, unerwartete Sinnesreize aktiviert und zeigen eine relativ geringe Aktivität in ruhigen Situationen. Eine hohe Aktivität der LC-Neurone erhöht die Noradrenalin-Konzentration im ZNS, was den Kortex stärker auf eingehende Reize reagieren lässt. Man kann davon ausgehen, dass der LC an der allgemeinen Erregung des Gehirns beteiligt ist und einen regulatorischen Effekt auf die Ansprechbarkeit des Gehirns auf neue Sinneseindrücke hat.

Der Locus coeruleus spielt eine Rolle in der Steuerung von Aufmerksamkeit und Wachheit (Aston-Jones, 2005), Schlaf-Wach-Rhythmus (Takahashi et al., 2010), Erregung („Arousal“) (Berridge, 2008) und Lern- und Erinnerungsvorgängen (Sara, 2009). Die genannten Aufgabenbereiche erklären die klinischen Implikationen in Verbindung mit einer noradrenergen Dysfunktion. So geht man bei Krankheitsbildern wie Narkolepsie, posttraumatischer Belastungsstörung oder Schlafstörungen von einer Beteiligung des LC aus (Berridge et al., 2012).

Noradrenerger Zellverlust im Locus coeruleus wird nicht nur im Rahmen der Parkinson-Krankheit beobachtet (vgl. Abschnitt 2.2.4), sondern auch bei Morbus Alzheimer (Zarow et al., 2003), Depression (Shibata et al., 2007) und Down-Syndrom (German et al., 1992).

Der Neurotransmitter des Locus coeruleus, Noradrenalin (NA), gehört gemeinsam mit Dopamin und Adrenalin zur Gruppe der Katecholamine. Abbildung 2.3 zeigt die einzelnen Schritte der NA-Synthese von der Aminosäure Tyrosin über Dopa und Dopamin. In allen Katecholamin-produzierenden Neuronen kommt das Enzym Tyrosinhydroxylase (TH) vor und stellt gleichzeitig den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt in der Neurotransmittersynthese



**Abbildung 2.3: Noradrenalinsynthese.** Noradrenalin entsteht in drei Schritten aus der Aminosäure Tyrosin. Geschwindigkeitsbestimmender Schritt in der Neurotransmittersynthese ist die Umwandlung von Tyrosin zu Dopa, katalysiert durch das Enzym Tyrosinhydroxylase.

dar. Im Unterschied zu dopaminergen Neuronen exprimieren die Zellen des LC zusätzlich die Dopamin- $\beta$ -Hydroxylase (DBH), die zur Identifikation noradrenerger Neurone herangezogen werden kann.

Noradrenalin entfaltet seine Wirkung über G-Protein-gekoppelte Adrenorezeptoren an den Zielzellen. Es gibt drei Familien dieser Rezeptoren, die als  $\alpha 1$ -,  $\alpha 2$ - und  $\beta$ -Rezeptoren bezeichnet werden.

### 2.2.3 Elektrophysiologische Eigenschaften der LC-Neurone

Die elektrophysiologischen Eigenschaften von LC-Neuronen wurden bisher weitgehend an Ratten untersucht. Sowohl *in vitro* als auch *in vivo* zeigen die Zellen eine intrinsische Aktivität (Foote et al., 1980; Williams et al., 1984). In Hirnschnitten der Ratte findet man ein regelmäßiges Entladungsmuster von etwa 1 bis 5 Hertz (Williams et al., 1984).

Die verschiedenen Ionenströme, die in Neuronen des LC gemessen werden konnten, umfassen Kalzium-abhängige und ATP-sensitive Kaliumströme (Murai et al., 1997; Koyama et al., 1999). In dissoziierten LC-Neuronen der Ratte konnten Kalziumströme gemessen werden, die durch L-, N-, P/Q- und R-

Typ-Kalziumkanäle vermittelt werden (Chieng and Bekkers, 1999). Außerdem konnten in LC-Neuronen der Maus TTX-sensitive Natriumströme und TEA-sensitive Kaliumströme gemessen werden. Diese beiden Ströme wurden im Intervall zwischen zwei Aktionspotentialen gemessen und mit der Generierung von intrinsischer Schrittmacheraktivität in Verbindung gebracht (de Oliveira et al., 2010).

Elektrophysiologische Messungen unter Anwesenheit des *gap junction*-Blockers Carbenoxolon haben gezeigt, dass LC-Neurone untereinander elektrotonisch gekoppelt sind, was ein synchrones Aktivitätsmuster der Zellen ermöglicht (Christie et al., 1989; Travagli et al., 1995; Ishimatsu and Williams, 1996; Alvarez et al., 2002). Diese Kopplung führt zu einer synchronen Ausschüttung von Noradrenalin im gesamten Versorgungsgebiet des LC.

### 2.2.4 Der Locus coeruleus und die Parkinson-Krankheit

Wie oben beschrieben finden sich bei Parkinson-Patienten unter anderem pathologische Veränderungen im Bereich des Locus coeruleus. Verschiedene Untersuchungen haben gezeigt, dass eine experimentelle Läsion des LC in Tiermodellen für Parkinson (MPTP, 6-OHDA) sowohl die durch die Toxingabe verursachten pathologischen Veränderungen in der SNpc als auch die damit verbundenen motorischen Symptome signifikant verstärkt (Mavridis et al., 1991; Marien et al., 1993; Srinivasan and Schmidt, 2003; Rommelfanger et al., 2007). Umgekehrt zeigen Mäuse, die eine noradrenerge Überinnervation aufweisen, eine niedrigere Vulnerabilität gegenüber MPTP (Kilbourn et al., 1998). Diese Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass Noradrenalin einen protektiven Charakter auf die nigrostriatale Leitungsbahn hat. Der genaue Mechanismus, wie LC-Neurone bzw. Noradrenalin diesen schützenden Effekt ausüben, ist bisher noch nicht ausreichend verstanden. Neben dem Effekt auf die pathologischen Veränderungen der SNpc scheint der Verlust von noradrenergen Zellen auch direkte Auswirkungen auf die motorischen Parkinson-Symptome zu haben (Rommelfanger and Weinshenker, 2007). Man geht demnach davon aus, dass der noradrenerge Zelluntergang sowohl Einfluss auf die Entstehung als

auch auf das Fortschreiten der Erkrankung nimmt (Gesi et al., 2000). Vor diesem Hintergrund erscheint der Locus coeruleus als ein sehr attraktives Ziel für eventuelle neuroprotektive Strategien, um die Parkinson-Krankheit in frühen, symptomarmen Stadien behandeln zu können.

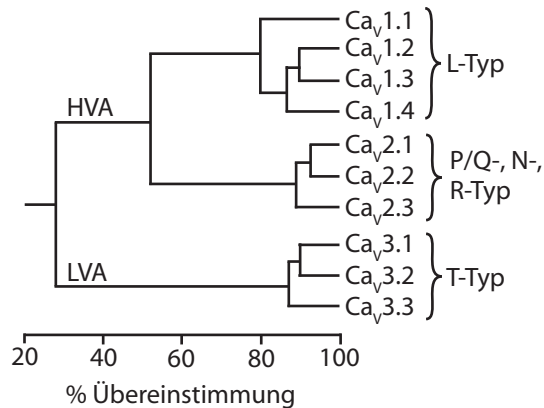
Als modulatorische Ziele im LC kommen insbesondere Ionenkanäle in Frage. Im LC sind eine Vielzahl von Ionenkanälen exprimiert, so auch spannungsabhängige Kalziumkanäle, auf die im Folgenden näher eingegangen werden soll.

### 2.3 Spannungsabhängige Kalziumkanäle

Kalziumkanäle sind in vielen verschiedenen Geweben im menschlichen Körper exprimiert und erfüllen eine Vielzahl physiologischer Funktionen. So sind Kalziumkanäle unter anderem dafür verantwortlich, die intrazelluläre Kalziumkonzentration zu kontrollieren. In Muskelzellen ist das Kontraktionsverhalten von der Verfügbarkeit von Kalzium abhängig; an der Synapse reguliert Kalzium das Verschmelzen von synaptischen Vesikeln mit der präsynaptischen Membran und damit die Freisetzung von Neurotransmittern. Auch die Expression verschiedener Gene und die Aktivität vieler Enzyme wie die des Zitratzyklus sind von der intrazellulären Kalziumkonzentration abhängig.

Aufgrund ihrer physiologischen Funktionen haben vor allem spannungsabhängige Kalziumkanäle auch therapeutische Bedeutung. In der Behandlung der arteriellen Hypertonie werden seit Jahrzehnten L-Typ-Kalziumkanalblocker (Dihydropyridine, DHP) eingesetzt. Weitere Indikationen für den Einsatz von Kalziumantagonisten sind die Migräneprophylaxe und die Alzheimer-Demenz.





**Abbildung 2.4: Spannungsabhängige Kalziumkanäle** werden nach ihrem elektrophysiologischen Verhalten in HVA- und LVA-Kanäle eingeteilt. Eine weitere Einteilung erfolgt nach der Übereinstimmung der Gensequenzen. Hier werden die porenbildenden Teile der  $\alpha_1$ -Untereinheiten der verschiedenen Kanäle miteinander verglichen. Danach unterscheidet man Kanäle des L-, P/Q-, N- und R-Typs (modifiziert nach Catterall et al. (2003)).

### 2.3.1 Einteilung und Lokalisation

Die Familie der spannungsabhängigen Kalziumkanäle umfasst zehn verschiedene Kanäle, die in unterschiedliche Gruppen eingeteilt werden (vgl. Abb. 2.4). Im Hinblick auf die Unterschiede in ihrem elektrophysiologischen Verhalten unterscheidet man Kanäle, die bei hohen Membranpotentialen öffnen („high voltage-activated“, HVA) von Kanälen mit einem niedrigeren Schwellenwert („low voltage-activated“, LVA). Zu den HVA-Kanälen gehören die Kanäle des L-Typs („long-lasting“, Ca<sub>v</sub>1.x) auf der einen und P/Q- („purkinje“), N- („neuronal“) und R-Typ-Kanäle („resistant“, Ca<sub>v</sub>2.x) auf der anderen Seite.

Während Ca<sub>v</sub>2.x-Kanäle vor allem in verschiedenen Regionen im Zentralen Nervensystem vorkommen, haben L-Typ-Kanäle sehr unterschiedliche Verbreitungsmuster. So findet man Ca<sub>v</sub>1.1-Kanäle fast ausschließlich in Myozyten des Skelettmuskels (Biel et al., 1991), wo sie für die Kopplung von Membrandepolarisation und intrazellulärer Kalziumfreisetzung verantwortlich sind. Ca<sub>v</sub>1.2 ist in vielen verschiedenen Geweben wie Herzmuskel, Blase, Prostata, Lunge, Gehirn, Fibroblasten, Nieren, Ovarien und Pankreas exprimiert (Biel et

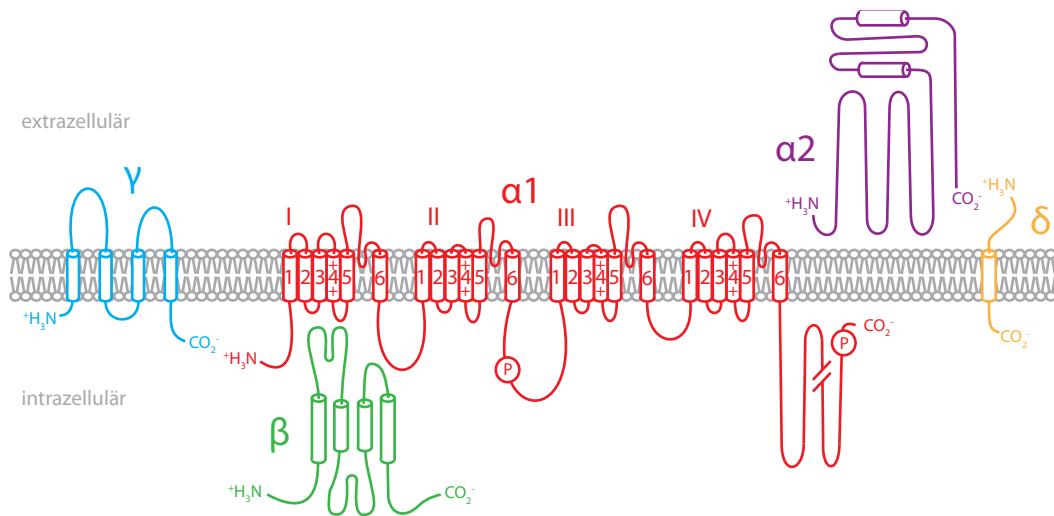
al., 1991).  $\text{Ca}_v1.3$  kommt in Gehirn, Pankreas, Nebenniere, den Schrittmacherzellen des Herzens und den Haarzellen des Innenohrs vor. Passend zu der genannten Lokalisation konnte bei  $\text{Ca}_v1.3$ -Knockout-Mäusen Taubheit und eine Dysfunktion des Sinusknotens festgestellt werden (Platzer et al., 2000). Kanäle des Typs  $\text{Ca}_v1.4$  sind vor allem in der Retina, aber auch in anderen Organen exprimiert (McRory et al., 2004). Eine Mutation im entsprechenden Gen konnte für angeborene Nachtblindheit verantwortlich gemacht werden.

Kalziumkanäle des T-Typs ( $\text{Ca}_v3.x$ ) öffnen bei niedrigeren Membranpotentialen und sind damit unter anderem gut geeignet, intrinsische Schrittmacherpotentiale zu generieren. Die weite Verbreitung dieser Kanäle in vielen verschiedenen Organen signalisiert, dass sie daneben noch eine Reihe weiterer physiologischer Funktionen erfüllen.  $\text{Ca}_v3.1$ - und  $\text{Ca}_v3.3$ -mRNA ist vor allem im Gehirn vorzufinden (Monteil et al., 2000; Lee et al., 1999),  $\text{Ca}_v3.2$  hauptsächlich in Leber und Niere (Williams et al., 1999). In geringerem Maße exprimieren auch Herz, Ovarien, Plazenta, Lunge, Skelettmuskel und Nebennierenrinde T-Typ-Kanäle.

### 2.3.2 Molekularer Aufbau

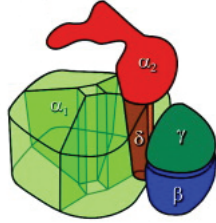
Spannungsabhängige Kalziumkanäle ( $\text{Ca}_v x.x$ ) bestehen aus vier bzw. fünf Untereinheiten (Abb. 2.5). Die größte und bedeutendste ist die  $\alpha_1$ -Untereinheit. Sie ist wiederum aus vier homologen Domänen aufgebaut (I-IV); jede Domäne besitzt sechs Transmembransegmente (S1-S6). Das Segment S4 beinhaltet positiv geladene Aminosäuren (Arginin und Lysin) und dient dem Kanal damit als Spannungssensor. Die Pore, die für die Ionenleitfähigkeit und die Selektivität des Kanals verantwortlich ist, wird von den Schleifen zwischen den Segmenten S5 und S6 gebildet (Catterall, 2000; Catterall et al., 2003; Lacínová, 2005). Die  $\alpha_1$ -Untereinheit kommt in zehn unterschiedlichen Varianten vor ( $\alpha_{1A}$ - $\alpha_{1I}$ ,  $\alpha_{1S}$ ) und gibt dem Kanal seinen Namen ( $\text{Ca}_v1.1$ - $\text{Ca}_v3.3$ ). Sie bestimmt das elektrophysiologische Verhalten der Kanäle und beinhaltet die Bindungsstellen für Pharmaka. Die für die  $\alpha_1$ -Untereinheit kodierenden Gene werden CACNA1A-CACNA1I bzw. CACNA1S genannt.

Daneben haben alle  $\text{Ca}_v$ -Kanäle eine teils extrazellulär, teils transmembranös gelegene  $\alpha_2\delta$ - und eine intrazelluläre  $\beta$ -Untereinheit. Die  $\alpha_1$ - und die  $\alpha_2\delta$ -Untereinheit binden über Disulfidbrücken aneinander. In Kalziumkanälen in Skelettmuskel, Herz und Gehirn findet sich außerdem eine  $\gamma$ -Untereinheit mit vier Transmembrandomänen (2.5). Diese Untereinheiten können wiederum in verschiedenen Varianten vorliegen und greifen modulatorisch in die Eigenschaften des jeweiligen Kanals ein (Catterall et al., 2003).



**Abbildung 2.5:  $\text{Ca}_v1$ -Kanal.** Schematische Darstellung der Untereinheiten eines spannungsabhängigen Kalziumkanals. Die  $\alpha_1$ -Untereinheit beinhaltet die porenbildenden Abschnitte und bestimmt die unterschiedlichen elektrophysiologischen und pharmakologischen Eigenschaften der Kanäle. Von ihr existieren zehn unterschiedliche Varianten, die den einzelnen Kanal-Subtypen ihre Bezeichnung geben. Die akzessorischen  $\alpha_2\delta$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Untereinheiten liegen ebenfalls in mehreren Varianten vor und modulieren die Eigenschaften der Kanäle (modifiziert nach Catterall (2000)).

Die räumliche Anordnung der Untereinheiten eines L-Typ-Kalziumkanals ist in Abbildung 2.6 schematisch dargestellt.



**Abbildung 2.6: Schematische Darstellung eines L-Typ-Kalziumkanals.** Der Kanal besteht aus fünf Untereinheiten, die im Verhältnis 1:1:1:1:1 zueinander stehen (modifiziert nach Wolf et al. (2003)).

### 2.3.3 L-Typ-Kalziumkanäle

L-Typ-Kalziumkanäle dienen, wie oben angedeutet (vgl. Abschnitt 2.2.2), einer Vielzahl physiologischer Funktionen in unterschiedlichen Zellen des Körpers. In Neuronen und Zellen des endokrinen Systems gehören die Regulation verschiedener Vorgänge zu den Aufgaben dieser Kalziumkanäle. Zu diesen Vorgängen gehören die Neurotransmitterfreisetzung, die Genexpression, die Stabilität der mRNA, das Überleben der Neurone, synaptische Plastizität und viele mehr. Nachdem 1987 der erste Dihydropyridin-sensitive Kalziumkanal geklont wurde (Tanabe et al., 1987), konnten im weiteren Verlauf der Forschung Kriterien zur Identifikation von L-Typ-Kalziumkanälen aufgestellt werden (Lipscombe et al., 2004). Diese sind:

1. Aktivierung durch starke Depolarisation der Membran
2. Hohe Sensitivität gegenüber Dihydropyridinen
3. Relativ langsame Aktivierungskinetik
4. Kalziumabhängige, nur geringe spannungsabhängige Inaktivierung
5. Große Einzelkanal-Leitfähigkeit

Neuere Untersuchungen zeigen, dass diese Kriterien nicht auf alle Kanäle des L-Typs zutreffen. Man muss also von einer hohen Diversität dieser Unterfamilie ausgehen. L-Typ-Kalziumkanäle gehören zu den HVA-Kanälen, d.h.

sie zeichnen sich dadurch aus, dass sie bei stärkerer Depolarisation öffnen. Koschak et al. haben gezeigt, dass  $\text{Ca}_v1.3$ -Kanäle etwa im gleichen Spannungsbereich öffnen wie Kalziumkanäle vom T-Typ (Koschak et al., 2001; Xu and Lipscombe, 2001). Die Bezeichnung als „high voltage-activated“ ist somit nicht für alle L-Typ-Kanäle zutreffend. Der niedrigere Schwellenwert des  $\text{Ca}_v1.3$ -Kanals macht ihn zu einem geeigneten Kandidaten, um Schrittmacherströme in Nervenzellen zu generieren.

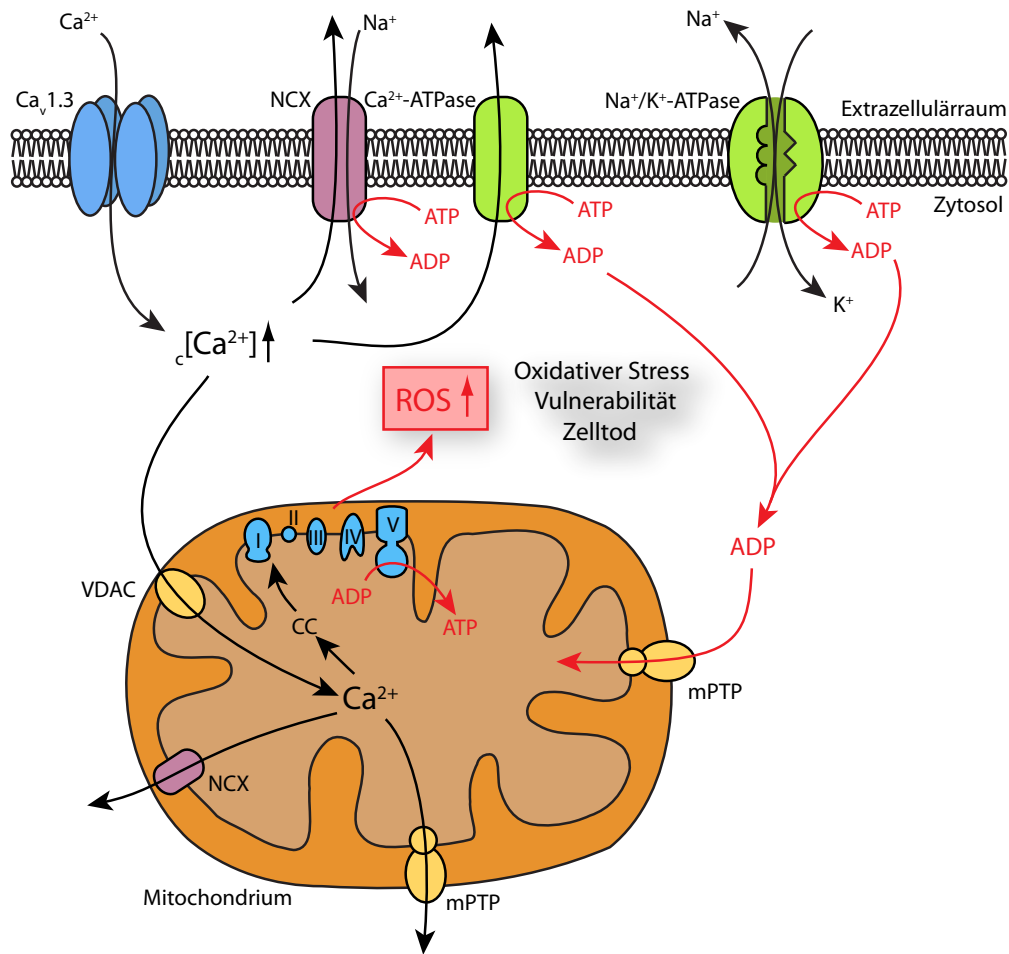
Auch im Ansprechen auf Dihydropyridine besteht ein Unterschied in der Gruppe der L-Typ-Kalziumkanäle. Prinzipiell sind alle L-Typ-Kalziumkanäle durch DHP antagonisierbar. Jedoch sind  $\text{Ca}_v1.3$ -Kanäle etwa 8,5fach weniger sensitiv auf Isradipin als  $\text{Ca}_v1.2$ -Kanäle (Koschak et al., 2001; Xu and Lipscombe, 2001). Die Effektivität der Blockade durch DHP ist abhängig vom Membranpotential der Zelle bzw. vom Öffnungsstatus des Kanals. Die Bindungskapazität des Pharmakons an den inaktivierten Zustand des Kanals, der besonders bei depolarisierten Membranpotentialen vorzufinden ist, ist um ein Vielfaches höher als die Bindungskapazität in normalem Ruhezustand (Bean, 1984).

## 2.4 Oxidativer Stress

Trotz jahrzehntelanger intensiver Forschung sind die Gründe, warum einzelne Regionen im Gehirn im Verlauf der Parkinson-Krankheit absterben, bis heute nicht vollständig geklärt. Ein Erklärungsansatz richtet das Augenmerk auf den Einfluss von oxidativem Stress auf das Überleben der Zelle. Die in Abbildung 2.7 dargestellte Kaskade zeigt einen möglichen Zusammenhang zwischen der intrinsischen Aktivität der Neurone und damit der Aktivität von Kalziumkanälen auf der einen bzw. der Produktion von Reaktiven Sauerstoffspezies und der daraus folgenden Belastung der Zelle durch oxidativen Stress auf der anderen Seite.

Grundlage des in diesem Modell gezeigten Mechanismus ist die in Abschnitt 4.4 gezeigte Tatsache, dass L-Typ-Kalziumkanäle während der autonomen Schrittmacheraktivität der LC-Neurone aktiv sind und somit kontinuierlich für  $\text{Ca}^{2+}$ -

Einstrom ins Zellinnere sorgen. Das im Zytoplasma akkumulierte Kalzium wird dann über verschiedene Mechanismen abtransportiert und stellt dadurch aus unterschiedlichen Gründen Stress für die Zellen dar. Neben der Pufferung von Kalzium durch zytoplasmatische Moleküle wie Calbindin oder Calretinin besteht ein Weg für das Kalzium aus dem Zytoplasma im Transport über die Zellmembran in den Extrazellulärraum. Dies kann entweder durch ATP-abhängige  $\text{Ca}^{2+}$ -Pumpen oder durch  $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher (NCX) erfolgen. Da beide Prozesse – auch aufgrund des sehr großen Konzentrationsgradienten für Kalzium über die Zellmembran – in hohem Maße energieaufwändig sind, führt die Verarbeitung von intrazellulärem Kalzium zu einem Anstieg des ADP/ATP-Quotienten. Der sinkende ATP-Spiegel in der Zelle stimuliert die ATP-Produktion und damit die Atmungskette in den Mitochondrien. Neben dem Transport aus der Zelle hinaus kann Kalzium auch von verschiedenen Zellkompartimenten wie dem Endoplasmatischen Retikulum oder dem Golgi-Apparat gepuffert werden. Über spannungsabhängige Anionenkanäle (VDAC) wird Kalzium unter anderem in die Mitochondrien aufgenommen. In der Mitochondrienmatrix fungiert Kalzium als Induktor des Zitratzyklus, der wiederum Reduktionsäquivalente für die Atmungskette zur Verfügung stellt. Auch dieser Weg führt somit zu einer Stimulation der oxidativen Phosphorylierung in den Mitochondrien. Als Nebenprodukt entstehen beim Elektronentransport über die Komplexe der Atmungskette Reaktive Sauerstoffspezies (ROS), die den Alterungsprozess der Zellen beschleunigen. Der schädigende Einfluss von ROS macht sich durch Oxidation von Proteinen und Lipiden bemerkbar, außerdem können sie schädigende Wirkung auf die mitochondriale und nukleäre DNA haben. Wenn die Kapazität protektiver Enzyme bzw. protektiver und reparativer Mechanismen erschöpft ist, resultiert dadurch eine beschleunigte Alterung und eine erhöhte Vulnerabilität der Zellen gegenüber äußeren Umwelteinflüssen wie Toxinen. Somit ist der kalziumvermittelte oxidative Stress ein Erklärungsansatz für das verfrühte Zellsterben von Neuronen des Locus coeruleus.



**Abbildung 2.7: Schematische Darstellung des Modells zur Erklärung von erhöhter ROS-Exposition von autonomen Neuronen.** Kontinuierliche, autonome Aktivität der LC-Neurone führt zu Einstrom von Kalzium durch L-Typ-Kalziumkanäle ( $\text{Ca}_v1.3$ ). Dadurch steigt die intrazelluläre Kalziumkonzentration. Intrazellulär akkumuliertes Kalzium kann auf verschiedenen Wegen das Zytoplasma verlassen: Mitochondrien können über spannungsabhängige Anionenkanäle (VDAC) Kalzium aufnehmen. Außerdem kann Kalzium via Natrium-Kalzium-Austauscher (NCX) oder Kalzium-ATPasen über die Plasmamembran in den Extrazellulärraum transportiert werden. Der ansteigende ADP/ATP-Quotient stimuliert die Produktion von ATP und bringt damit die Atmungskette an der inneren Mitochondrienmembran in Gang. Der steigende Kalziumspiegel in den Mitochondrien wirkt anregend auf den Zitratzyklus (CC), der wiederum Reduktionsäquivalente für die Atmungskette bereitstellt; die Oxidative Phosphorylierung wird stimuliert. Der Elektronentransport über die Komplexe der Atmungskette führt zur Bildung von Reaktiven Sauerstoffspezies (ROS). Ein vermehrter Anfall Reaktiver Sauerstoffspezies bedeutet erhöhten oxidativen Stress für die Zelle und ist somit vergleichbar mit einem beschleunigten Altern und früher Apoptose der Zelle (modifiziert nach Surmeier et al. (2010)).

## 2.5 Ziele der Arbeit

Ziel dieser Arbeit ist zunächst, die Gehirnpräparation von Mäusen und die Patch-Clamp-Technik im Hirnschnitt an Locus coeruleus-Neuronen zu erlernen und zu etablieren. Die Identifikation der noradrenergen LC-Neurone anhand von anatomischen, morphologischen, molekularbiologischen und elektrophysiologischen Merkmalen spielt hier eine zentrale Rolle.

Inhaltlich soll das elektrophysiologische Verhalten der murinen LC-Neurone näher untersucht werden. Besonderes Augenmerk wird hier auf die intrinsische Schrittmacheraktivität der Zellen und die diese beeinflussenden Leitfähigkeiten gelegt. Die Tatsache, dass sowohl Neurone der Substantia nigra als auch die des Locus coeruleus bei der Parkinson-Krankheit zugrunde gehen, wirft die Frage nach eventuellen Gemeinsamkeiten in den elektrophysiologischen Eigenschaften auf, die die erhöhte Vulnerabilität der beiden Zellarten erklären könnten.

Eine mögliche Erklärung für diese erhöhte Vulnerabilität ist das hohe Maß an oxidativem Stress, dem SNpc-Zellen generell ausgesetzt sind, wie kürzlich gezeigt werden konnte (Guzman et al., 2010). Nach dem in Abschnitt 2.4 beschriebenen Modell führt die Beteiligung von spannungsabhängigen Kalziumkanälen in den Neuronen der SNpc zu einer erhöhten Belastung durch intrazytoplasmatisches Kalzium und damit letztendlich zu einer gesteigerten Produktion freier Sauerstoffradikale (Surmeier et al., 2011).

Die Frage, ob ein vergleichbarer Mechanismus auch in Zellen des Locus coeruleus zu vermuten ist, soll in dieser Arbeit behandelt werden. Insbesondere soll die Rolle, die L-Typ-Kalziumkanäle im Schrittmachermechanismus der LC-Neurone spielen, mithilfe von spezifischen L-Typ-Kalziumkanalantagonisten untersucht werden.

Die oben genannten Untersuchungen werden angestellt, um letztlich die Frage zu klären, ob die Blockade spannungsabhängiger Kalziumkanäle einen protektiven Effekt auf LC-Neurone hat und der Locus coeruleus damit ein mögliches therapeutisches Ziel in der Parkinson-Behandlung darstellt.



## 3 Material und Methoden

### 3.1 Elektrophysiologie

#### 3.1.1 Pharmaka

Die eingesetzten Substanzen wurden von folgenden Firmen bezogen:

ATP-MG	Sigma Aldrich
CaCl <sub>2</sub>	Sigma Aldrich
CGP 35348	Sigma Aldrich
D(+)-Glucose	Sigma Aldrich
D(-)-AP-5	Sigma Aldrich
EGTA-K	Tocris
Gabazin	Sigma Aldrich
GTP-Na	Sigma Aldrich
HEPES-K	Sigma Aldrich
KCl	Sigma Aldrich
Ketamin	Tocris
K-MeSO <sub>4</sub>	Invitrogen
MgCl <sub>2</sub>	Sigma Aldrich
NaCl	Sigma Aldrich
NaHCO <sub>3</sub>	Sigma Aldrich
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Sigma Aldrich
NBQX Hydrat	Sigma Aldrich
Phosphokreatinin-di(tris)	Sigma Aldrich
Xylazin	Invitrogen

#### 3.1.2 Versuchstiere

Für die elektrophysiologischen Experimente wurden männliche Mäuse (*Mus musculus*) vom Wildtyp (C57Bl/6, Black 6) verwendet. Alle Tiere waren im Alter zwischen 19 und 30 Tagen. Die Tiere wurden von der Firma Charles River bezogen. Die Tierhaltung sowie sämtliche an den Tieren durchgeführten Eingriffe wurden gemäß der Richtlinien „Guide for the Care and Use of Laboratory Animals“, die von den US National Institutes of Health (NIH) publiziert wurden (NIH Publication No. 85-23, 1996), durchgeführt.

#### 3.1.3 Präparation der Mäuse

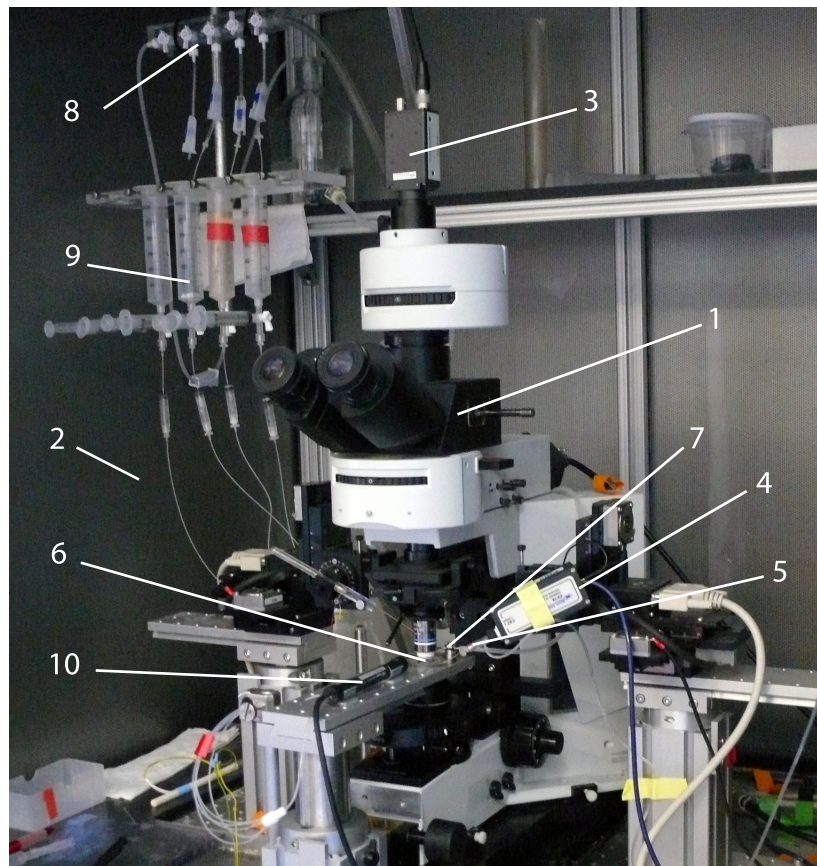
Die verwendeten Mäuse wurden zuerst mittels intraperitonealer Injektion eines Anästhetikums (Ketamin 50 mg/kg und Xylazin 4,5 mg/kg) narkotisiert. Nach vollständigem Eintritt der Wirkung des Anästhetikums erfolgte eine Perfusion, um das gesamte im Kreislauf befindliche Blut des Tieres durch eiskaltes ACSF („artificial cerebrospinal fluid“, künstlicher Liquor) zu ersetzen. Dafür wurde unter Narkose das Herz der Maus durch Präparation freigelegt und mittels einer Intervallpumpe die Lösung in den Kreislauf des Tieres eingeleitet. Über einen Schnitt im rechten Vorhof des Herzens wurde das Blut abgelassen. Nach vollständiger Perfusion wurden die Mäuse durch Dekapitation getötet. Das Gehirn wurde anschließend rasch aus dem Schädel präpariert und in eiskaltes ACSF, das mit Carbogen (95 % O<sub>2</sub>, 5 % CO<sub>2</sub>) begast wurde, gegeben. Mithilfe eines Vibratoms (Leica VT 1000 S) wurden 220 µm dünne horizontale Gewebeschnitte (slices) angefertigt und mediosagittal durchtrennt, um die linke und die rechte LC-Region nacheinander untersuchen zu können. Die slices, in denen sich LC-Neurone befanden, wurden während des slice-Vorgangs makroskopisch anhand der anatomischen Gegebenheiten identifiziert. Als anatomische Landmarke diente der vierte Ventrikel, an dessen Boden sich der LC befindet. Dort stellt sich der Locus coeruleus als kleiner, nahe dem vierten Ventrikel gelegener Kern aus dicht gepackten, relativ großen Zellkörpern dar.

Die hergestellten slices wurden vor dem Beginn der Experimente für 30 Minuten in einem Wasserbad („Fisher Scientific Isotemp 202S“) auf 34°C in ACSF inkubiert. Diese Inkubationszeit ist notwendig, damit sich die Gewebeschnitte von der ischämischen Periode und vom physikalischen Trauma während der Präparation erholen können. Daneben wird während dieser Phase das verwendete Ketamin/Xylazin-Gemisch aus dem Gewebe ausgewaschen. Dies ist wichtig für die Qualität und Aussagekraft der elektrophysiologischen Experimente, da sowohl Ketamin (NMDA-Rezeptor-Antagonist) als auch Xylazin ( $\alpha_2$ -Adrenozeptor-Agonist) unmittelbar auf die Ionenkonzentrationen sowie den Erregungszustand der Zellen Einfluss nehmen.

#### 3.1.4 Elektrophysiologische Messungen

Elektrophysiologische Messungen wurden mithilfe der Patch-Clamp-Technik durchgeführt. Dafür wurden die Gewebeschnitte nach Ablauf der Inkubationszeit in eine Messkammer überführt, die auf dem fixierten Objektstisch eines aufrechten Mikroskops („BX50WI“, Olympus) angebracht war. Die Messkammer wurde während der Messungen ständig mit Carbogen-gesättigter ACSF-Lösung perfundiert. Die Lösung wurde mithilfe des Heizgeräts „SH-27B“ mit der Kontrolleinheit „TC-324 B“ der Firma Warner Instruments auf  $34 \pm 1$  °C eingestellt. Die Flussrate der Perfusionslösung betrug 2-3 ml/min. Für die Visualisierung der Zellen während der Experimente wurde die Kamera „Oly-150“ der Firma Olympus verwendet. Abbildung 3.1 zeigt eine Aufnahme des Patch-Clamp-Messplatzes.

Elektrophysiologische Untersuchungen wurden mit dem Verstärker „Multi-Clamp 700 A“ und dem Analog/Digital-Wandler „Digidata 1322 A“ der Firma Axon durchgeführt. Bei Experimenten an GFP-markierten Zellen kam das „Enfo X-Cite 120 PC Fluorescence Illumination System“ zum Einsatz. Das liquid junction potential betrug ca. 7 mV und wurde nicht korrigiert.



**Abbildung 3.1: Patch-Clamp-Messplatz.** Das aufrechte Mikroskop (1) befand sich innerhalb eines Faraday-Käfigs (2) und war mit einer Kamera (3) ausgestattet. An der *headstage* (4) war die Messelektrode (5) befestigt, die seitlich in die Messkammer (6) hineinragte. Die Badelektrode (7) war hinter der Messkammer angebracht. Über eine Vorrichtung zur Gaszufuhr (8) wurde die Messlösung, die sich in den dafür vorgesehenen Gefäßen (9) befand, mit Carbogen (95 % O<sub>2</sub>, 5 % CO<sub>2</sub>) versetzt. Über einen beheizbaren Zulauf (10) gelangte die Messlösung in die Messkammer.

Die Messelektroden wurden aus Borosilikatglas mithilfe des Pipettenziehers „P-97“ von Sutter Instruments hergestellt. Die für die Messungen verwendeten Pipetten hatten einen Pipettenwiderstand von 2,7-4,3 M $\Omega$ .

#### 3.1.5 Messlösungen

Sofern nicht anders angegeben wurde bei den elektrophysiologischen Messungen eine Messlösung bestehend aus 125 nM NaCl, 2,5 mM KCl, 25 mM NaHCO<sub>3</sub>, 1,25 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM MgCl<sub>2</sub> und 25 mM D(+)-Glucose verwendet. Als Pipettenlösung kam eine Kaliummethylsulfat-basierte Messlösung zum Einsatz (135 mM K-MeSO<sub>4</sub>, 5 mM KCl, 5 mM HEPES-K, 0,05 mM EGTA-K, 10 mM Phosphokreatinin-di(tris), 2 mM ATP-Mg, 0,5 mM GTP-Na). Alle Messlösungen hatten einen physiologischen pH-Wert von 7,25-7,45.

Bei den elektrophysiologischen Experimenten wurde generell mit Substanzen gearbeitet, die den synaptischen Input, dem die Neurone ausgesetzt sind, blockieren. Dafür wurde Gabazin (GABA<sub>A</sub> Antagonist, 10  $\mu$ M), CGP 35348 (GABA<sub>B</sub> Antagonist, 1  $\mu$ M), D(-)-AP-5 (NMDA-Rezeptor Antagonist, 50  $\mu$ M) und NBQX Hydrat (AMPA-Rezeptor Antagonist, 5  $\mu$ M) verwendet.

#### 3.1.6 Programme zur Datenanalyse

Die Messdaten wurden mittels des Programms „Clampex 10.0“ (Molecular Devices) erfasst. Zur Auswertung dienten die Programme „Clampfit 10.0“ (Molecular Devices) sowie „Igor Pro 6“ (WaveMetrics). Für statistische Analysen wurde „Office Excel 2007“ (Microsoft) benutzt.

#### 3.1.7 Statistische Auswertungen

Zu vergleichende Datensätze wurden anhand des zweiseitigen Student's T-Tests auf signifikante Unterschiede überprüft. Der T-Test prüft, ob sich die Mittelwerte zweier Datensätze statistisch voneinander unterscheiden. Der p-Wert als Maß für die Irrtumswahrscheinlichkeit, d.h. für die Wahrscheinlichkeit, mit der die verglichenen Daten statistisch nicht unterschiedlich sind, wird

mit zunehmender Signifikanz kleiner. Signifikanz wurde für p-Werte kleiner als 0,05 (\*) oder 0,01 (\*\*) angenommen.

## 3.2 Imaging

### 3.2.1 Präparation des Gewebes

Im ersten Schritt wurde der Pipettenlösung 0,20 % Biocytin zugesetzt. Die zu markierende Zelle wurde dann in einer herkömmlichen Ableitung im whole-cell Modus für etwa 10 Minuten gemessen. Während dieser Zeit kommt es natürlicherweise zu einem Austausch von Pipettenlösung und Zellinnerem, was zur Folge hat, dass sich Biocytin im gesamten Zellkörper sowie in den Dendriten des Neurons ausbreitet. Der Gewebeschnitt wurde daraufhin in einer Fixationslösung (enthält 4 % Paraformaldehyd, 14 % Pikrinsäure) fixiert und in phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) gewaschen. Die im Gewebe enthaltenen Zellmembranen wurden mit Triton-haltiger Lösung aufgelöst. Nach erneutem Waschen in PBS wurden die Gewebeschnitte über Nacht in „Streptavidin, Alexa Fluor® 594“ (Invitrogen) inkubiert. Der Streptavidinanteil dieser Verbindung bindet mit einer hohen Affinität an Biotin-Verbindungen, so auch an Biocytin. Die andere Komponente der Substanz ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der bei externer Erregung Lichtwellen mit einer Wellenlänge von 594 nm (rot) aussendet.

### 3.2.2 Mikroskopie

Um die so markierten Locus coeruleus-Neurone visualisieren zu können, wurde konfokale Lichtmikroskopie angewandt. Die Bilder wurden mithilfe des „LSM 510 META“ Mikroskops (Zeiss) angefertigt.

### 3.3 Molekularbiologie

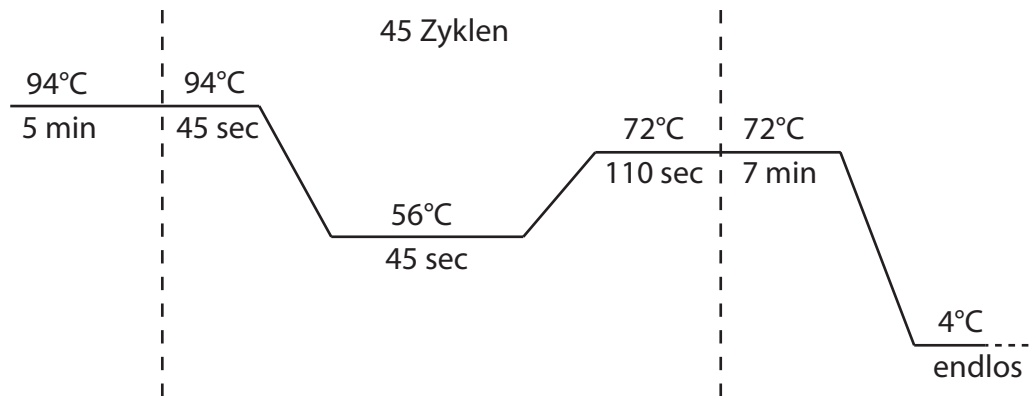
Um die untersuchten Neurone identifizieren und deren mRNA-Profil näher untersuchen zu können, wurden einzelne Zellen auf deren genetisches Expressionsmuster hin untersucht.

Dabei wurden die Zellen bei den Experimenten einzeln aus dem Hirnschnitt nach der elektrophysiologischen *whole cell*-Messung in die mit RNase-freier Pipettenlösung befüllte Pipette aspiriert und in einem Eppendorfgefäß asserviert.

Das Gefäß enthielt eine Mischung verschiedener für die Durchführung einer reversen Transkription notwendiger Substanzen und wurde sofort nach Einbringen der Zellen auf Eis kalt gestellt. Die im Eppendorfgefäß enthaltene Mischung enthielt 0,7  $\mu$ l Suprase-IN (20U/ $\mu$ l, RNase-Inhibitor, Ambion), 1,9  $\mu$ l Diethyldicarbonat-behandeltes Wasser (Inaktivierung von RNasen), 1  $\mu$ l dNTP-Mix (10 mM, Desoxyribonukleinsäuren), 0,7  $\mu$ l BSA (143  $\mu$ g/ $\mu$ l, Albumin) und 0,7  $\mu$ l oligo-DT (0,5  $\mu$ g/ $\mu$ l, Primer). Diese Mischung wurde gemeinsam mit dem dazugegebenen Zellinhalt für fünf Minuten auf 65°C erhitzt, um die enthaltene mRNA zu linearisieren und anschließend für eine Minute auf Eis gestellt. Die Synthese der Einzelstrang-cDNA wurde durch die Zugabe folgender Substanzen eingeleitet: 2  $\mu$ l 10fach PCR-Puffer, 4  $\mu$ l MgCl<sub>2</sub>, 2  $\mu$ l DTT (0,1 M), 1  $\mu$ l RNaseOut (40 U/ $\mu$ l, RNase-Inhibitor) und 6  $\mu$ l Diethyldicarbonat-behandeltes Wasser. Dieser Ansatz wurde anschließend für zwei Minuten bei 42°C inkubiert. Nach dieser ersten Inkubation wurde 0,7  $\mu$ l Superscript II (50 U/ $\mu$ l, Reverse Transkriptase) hinzugegeben und für weitere 50 Minuten bei 42°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch das Erhitzen auf 70°C für 15 Minuten beendet. Um die Einzelstrang-cDNA aus dem RNA-DNA-Hybrid zu lösen, wurde anschließend 0,5  $\mu$ l RNase H (2 U/ $\mu$ l) hinzugegeben. Mit Ausnahme des Suprase-IN wurden alle oben genannten Substanzen von der Firma Invitrogen bezogen.

Die cDNA der einzelnen Zellen wurde mithilfe einer Polymerasekettenreaktion (PCR) amplifiziert. Der Reaktionsansatz für die PCR enthielt 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,5

mM dNTP-Mix, 1  $\mu$ M Primer, 2,5 U Taq DNA-Polymerase, 5  $\mu$ l 10fach-Puffer 2-4  $\mu$ l cDNA. Die Sequenz der Primer setzte sich wie folgt zusammen: TH-Primer: CAGGACATTGGACTTGCATCT und ATAGTTCCTGAGCTTGT-CCTTG; DBH-Primer: GCCCTCCCTTCCTGTGTGAA und TTGTCACG-GCATACACTAACA;  $\text{Ca}_v1.3$ -Primer: CTGACTCGGGACTGGTCTATTC und CTGGAGGGACAACCTTGGTCAAGCA (jeweils in 5'-3'-Richtung). Die entstandenen PCR-Produkte hatten die folgenden Größen: 297 bp (TH), 305 bp (DBH) und 379 bp ( $\text{Ca}_v1.3$ ). Durch Erhitzen des Ansatzes auf 94°C wurde die DNA zunächst denaturiert. Bei einer Temperatur von 45°C erfolgte die Anlagerung der Primer an die Einzelstrang-DNA. Nach einer erneuten Temperaturerhöhung auf 72°C wurde die DNA-Polymerase-Reaktion gestartet. Insgesamt wurde dieser Vorgang 45mal durchgeführt (Abb. 3.2).



**Abbildung 3.2: PCR-Protokoll**

Nach der Amplifizierung der DNA wurde diese mit Ethidiumbromid markiert und auf ein Agarosegel (2 %) aufgetragen. Die gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte erfolgte anschließend durch Anlegen einer Spannung von 100 mV über 20 Minuten. Mittels UV-Licht-Bestrahlung konnten die entstandenen Banden visualisiert werden.



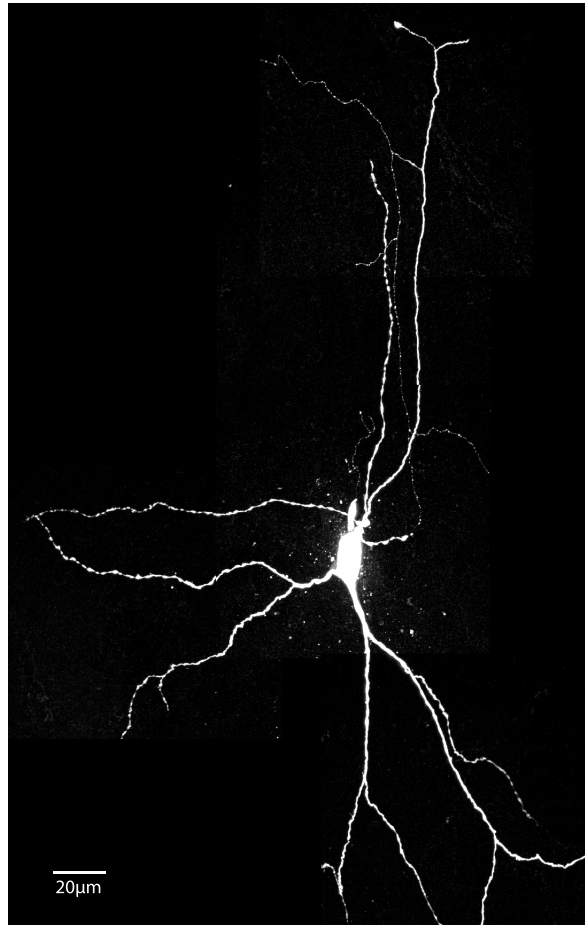
## **4 Ergebnisse**

### **4.1 Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen von LC-Neuronen**

Zu Beginn der Experimente an Locus coeruleus-Neuronen der Maus standen anatomische und morphologische Fragestellungen im Vordergrund. Die Identifizierung der richtigen anatomischen Region bzw. der Nachweis, auch tatsächlich Neurone des Locus coeruleus untersucht zu haben, geschah nicht nur über die Bestimmung des spezifischen Expressionsmusters dieser Zellen, sondern auch mittels Untersuchung der Zellmorphologie und der korrekten anatomischen Lage im Gewebeschnitt. Als anatomische Landmarke wurde der vierte Ventrikel genutzt, an dessen Boden sich der Locus coeruleus befindet.

Es wurden durchweg horizontale Gewebeschnitte angefertigt, da in Hirnschnitten der Ratte gezeigt werden konnte, dass im Vergleich zur koronalen Schnittführung bei der horizontalen die Anzahl der nach dem slice-Vorgang erhaltenen Dendriten signifikant höher war (Travagli et al., 1996). Da hieraus geschlossen werden kann, dass die LC-Neurone in horizontalen Schnitten durchschnittlich weniger beschädigt sind, wurde bei sämtlichen elektrophysiologischen Experimenten diese Vorgehensweise gewählt. Um die von Travagli et al. in der Ratte beobachteten Resultate auch auf die Maus übertragen zu können, wurden Bilder von murinen LC-Neuronen aus horizontalen Schnitten angefertigt und deren Dendritenanzahl mit den Ergebnissen von Travagli et al. verglichen. Es wurden hierbei die sich nicht mehr verzweigenden Zellfortsätze gezählt.

Die untersuchten Zellen wurden während der Messung in der *whole cell*-Konfiguration durch Applikation von 0,2 % Biocytin in die Pipettenlösung markiert und nach dem Fixiervorgang mithilfe von konfokaler Mikroskopie visualisiert. Bei dem in Abbildung 4.1 dargestellten Neuron können 16 Dendriten gezählt werden. Diese Anzahl liegt in dem Bereich, den auch Travagli et al. in horizontalen Schnitten beobachten konnten ( $15,1 \pm 0,07$ ).



**Abbildung 4.1: Locus coeruleus-Neuron.** Die Zellen wurden im Hirnschnitt belassen und elektrophysiologisch untersucht. Im *whole cell*-Modus wurden die Neurone über die Pipette mit 0,2 % Biocytin befüllt und fluoreszenzmikroskopisch analysiert. Anzahl der sich nicht verzweigenden Dendriten: 16; Größe des Zellkörpers: 19  $\mu\text{m}$ . Die Grafik wurde mittels konfokaler Mikroskopie hergestellt.

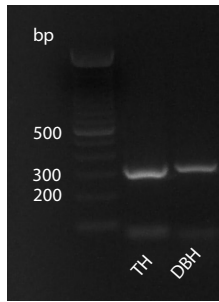
Der Zellkörper des hier abgebildeten Neurons hat einen maximalen Durchmesser von  $19\mu\text{m}$ . Auch dieser Wert ist mit früher beschriebenen Messwerten für Somata von LC-Neuronen vereinbar (Travagli et al., 1996; Touret et al., 1982).

## **4.2 Molekularbiologische Charakterisierung des Expressionsmusters von Locus coeruleus Neuronen**

### **4.2.1 Enzyme der Katecholaminsynthese**

Um nachweisen zu können, dass die untersuchten Zellen tatsächlich noradrenerge Neurone – und damit Zellen des LC – sind, wurde im Anschluss an einige elektrophysiologische Messungen das Zellinnere mit Unterdruck in die Pipette gesaugt und dieses Material mittels scRT-PCR auf die Enzyme Tyrosinhydroxylase (TH) und Dopamin- $\beta$ -Hydroxylase (DBH) untersucht. Beide Enzyme sind für unterschiedliche Schritte während der Katecholaminsynthese zuständig. Tyrosinhydroxylase katalysiert die Reaktion von Tyrosin zu Dopa, Dopamin- $\beta$ -Hydroxylase die Umwandlung von Dopamin zu Noradrenalin.

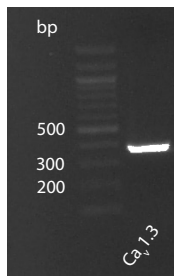
Um die Expression der Enzyme TH und DBH nachweisen zu können, wurde, wie in Abschnitt 3.3 beschrieben, die amplifizierte DNA einzelner Neurone sowie ein Marker auf ein Agarosegel (2 %) aufgetragen. Zuvor wurden die PCR-Produkte mit Ethidiumbromid markiert, um sie im Anschluss mittels UV-Licht sichtbar machen zu können. Durch Anlegen einer Spannung von 100 mV über 20 Minuten erfolgte eine elektrophoretische Auftrennung. In Abbildung 4.2 ist ein Gel nach einer solchen Auftrennung abgebildet. Darauf erkennt man zwei Banden, deren Größe anhand des Markers auf ca. 300 bp zu bestimmen ist. Diese Größe entspricht den erwarteten Werten für TH (297 bp) und DBH (305 bp). Sieben der untersuchten zehn Zellen zeigen eine Expression beider Enzyme.



**Abbildung 4.2: scRT-PCR.** Agarosegel (2 %) nach elektrophoretischer Auftrennung (100 mV, 20 min.). PCR-Produkte wurden mit Ethidiumbromid markiert und durch UV-Licht sichtbar gemacht. Die beiden Banden zeigen eine Größe von etwa 300 bp. Die erwarteten Werte sind 297 bp (TH) bzw 305 bp (DBH). Sieben der untersuchten zehn Zellen zeigen eine Expression beider Enzyme.

#### 4.2.2 Kalziumkanal $Ca_v1.3$

Der Kalziumkanal  $Ca_v1.3$  gehört zu der Familie der L-Typ-Kalziumkanäle und konnte im Gehirn der Maus in verschiedenen Regionen nachgewiesen werden (Sukiasyan et al., 2009). Um zu zeigen, dass auch murine LC-Neurone diesen Kanal exprimieren, wurden wiederum scRT-PCR Experimente durchgeführt. Wie oben beschrieben, wurde das PCR-Produkt mit Ethidiumbromid markiert und neben einem Marker auf ein Agarosegel (2 %) aufgetragen. Nach elektrophoretischer Auftrennung (100 mV, 20 min.) konnte durch UV-Bestrahlung eine Bande im Bereich von knapp 400 bp sichtbar gemacht werden, was mit dem erwarteten Wert von 379 bp vereinbar ist. In Abbildung 4.3 ist ein solches Agarosegel abgebildet. Bei drei der untersuchten zehn Zellen konnte eine deutliche Expression nachgewiesen werden.



**Abbildung 4.3: scRT-PCR.** Agarosegel (2 %) nach elektrophoretischer Auftrennung (100 mV, 20 min.). PCR-Produkte wurden mit Ethidiumbromid markiert und durch UV-Licht angeregt. Die Bande wird bei der Markierung von knapp 300 bp sichtbar. Der erwartete Wert für den  $Ca_v1.3$  Kanal ist 379 bp. Drei der untersuchten zehn Zellen zeigen eine Expression des  $Ca_v1.3$ -Kanals.

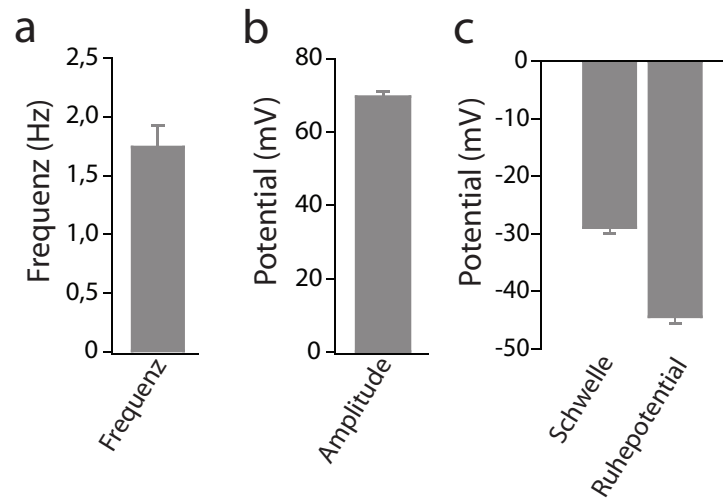
## 4.3 „Pacemaking“ in Locus coeruleus Neuronen

### 4.3.1 Schrittmacherfunktion

Die überwiegende Mehrzahl der untersuchten Locus coeruleus-Neurone (98 von 103 Zellen) zeigte eine spontane, intrinsische Aktivität in Form von regelmäßigen Aktionspotentialen (AP). Diese Schrittmacheraktivität („pacemaking“) konnte unabhängig von jeglichem synaptischem Input beobachtet werden. Bei allen Messungen wurde ein Blockercocktail bestehend aus Gabazin ( $\text{GABA}_A$  Antagonist,  $10 \mu\text{M}$ ), CGP 35348 ( $\text{GABA}_B$  Antagonist,  $1 \mu\text{M}$ ), D(-)-AP-5 (NMDA-Rezeptor Antagonist,  $50 \mu\text{M}$ ) und NBQX Hydrat (AMPA-Rezeptor Antagonist,  $5 \mu\text{M}$ ) zur ACSF-Messlösung hinzugefügt, womit sichergestellt wurde, dass jede dann noch messbare Schrittmacheraktivität intrinsisch entsteht.

Bei den gemessenen LC-Neuronen konnten Schrittmacherfrequenzen im Bereich von 0,8-3,8 Hz (Mittelwert  $1,75 \pm 0,18 \text{ Hz}$ ,  $n = 98$ ) beobachtet werden (Abb. 4.4, a).

Das Ruhemembranpotential der gemessenen Zellen lag im Mittel bei  $-44,58 \pm 1,03 \text{ mV}$  ( $n = 24$ ). Als Schwellenwert, bei dessen Erreichen ein Aktionspotential ausgelöst wird, wurde  $-29,15 \pm 0,96 \text{ mV}$  ( $n = 24$ ) gemessen. Die Amplitude der Aktionspotentiale, gemessen vom Schwellenwert bis zum peak, betrug im Durchschnitt  $69,78 \pm 1,20 \text{ mV}$  ( $n = 24$ ) (Abb. 4.4, b+c).



**Abbildung 4.4: Schrittmacheraktivität.** Elektrophysiologische Messungen wurden an slices unter Anwesenheit synaptischer Blocker (vgl. Abschnitt 3.1.4) durchgeführt. **a:** AP-Frequenz. *cell attached*-Messungen, *voltage clamp*-Modus, Haltepotential 0 mV. **b:** AP-Amplitude, gemessen vom Schwellenwert bis zum peak. *whole cell*-Messungen, *current clamp*-Modus, keine Strominjektion. **c:** Schwellenwert und Ruhemembranpotential. *whole cell*-Messungen, *current clamp*-Modus, keine Strominjektion. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert mit Standardfehler.

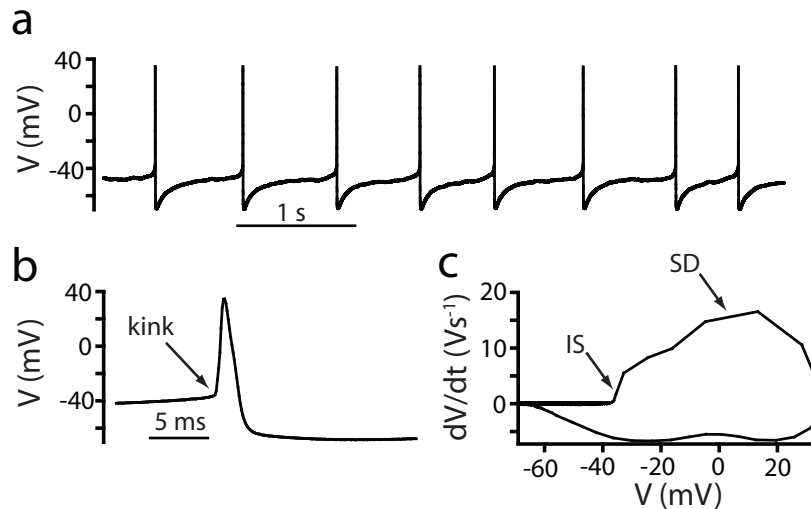
#### 4.3.2 Aktionspotentiale – Morphologie

Zur Analyse der Aktionspotential-Morphologie der LC-Neurone wurden elektrophysiologische Messungen im *whole cell*-Modus (*current clamp*, keine Strominjektion) durchgeführt. Alle Untersuchungen erfolgten an Hirnschnitten in Anwesenheit der oben genannten synaptischen Blocker. Die Morphologie der Aktionspotentiale der Locus coeruleus-Neurone ist in Abbildung 4.5 für eine Reihe von APs illustriert. Die Aktionspotentialfrequenz beträgt in diesem Beispiel 1,45 Hz; das Ruhemembranpotential liegt hier bei -48 mV (4.5, a).

Ein einzelnes AP ist in Abbildung 4.5, b vergrößert dargestellt. Die Morphologie ähnelt in einigen Parametern der von dopaminergen Neuronen der Substantia nigra pars compacta im Hirnschnitt (Bean, 2007). Man kann auch im Aktionspotential der LC-Neurone deutlich zwei Komponenten der Erregungsaus-

breitung erkennen. Um dieses Phänomen näher untersuchen zu können, wurde hier ein einzelnes AP in Form eines „phase plots“, bei dem die Veränderung des Membranpotentials über die Zeit ( $dV/dt$ ) gegen das Membranpotential aufgetragen ist, dargestellt (Abb. 4.5, c). Die eigentliche Spitze der Erregung („spike“), deren zelluläres Korrelat im somatisch-dendritischen (SD) Bereich der Zelle anzusiedeln ist, ist im phase plot als größter Ausschlag nach oben dargestellt. Dem voraus geht eine kleinere Komponente, die als Erregung des initialen Segments des Axons interpretiert wird (Shu et al., 2007). Der Erregungsursprung in LC-Neuronen liegt also nicht auf der dendritischen Seite der Zelle, sondern im Initialsegment (IS) des Axons.

Eine weitere Gemeinsamkeit zu den Aktionspotentialen, die man in SNpc-Neuronen beobachten kann, ist der abrupte, rasche Anstieg des Membranpotentials zu Beginn des AP (Abb. 4.5, b). Anders als bei APs, deren Initiierung von den Dendriten ausgeht, bildet die Kurve an dieser Stelle einen regelrechten Knick, den Naundorf et al. als „kink“ bezeichnen (Naundorf et al., 2006).



**Abbildung 4.5: Morphologie der Aktionspotentiale.** **a:** Intrinsische Schrittmacheraktivität in einem LC-Neuron, *whole cell*-Messung, *current clamp*-Modus, keine Strominjektion. **b:** AP in höherer Auflösung; zu sehen ist ein abrupter Anstieg des Membranpotentials („kink“). **c:** zugehöriger phase plot des AP; der Aufstrich ist in zwei Komponenten gegliedert: eine frühe, vom initialen Segment (IS) ausgehende, und eine späte Komponente, die die Erregung des somatisch-dendritischen (SD) Bereichs repräsentiert.

#### 4.4 Effekt von Isradipin auf die Schrittmacherfunktion

Um die Rolle der L-Typ-Kalziumkanäle auf die Schrittmacherfunktion von LC-Neuronen zu untersuchen, wurde der Kalziumkanalblocker Isradipin verwendet. Dieses Pharmakon gehört zu der Klasse der Dihydropyridine (DHP) und wirkt antagonistisch auf L-Typ-Kalziumkanäle.

In dopaminergen Neuronen der Substantia Nigra pars compacta wird der Einfluss dieser Kanäle schon seit vielen Jahren untersucht und diskutiert. Lange Zeit war man davon ausgegangen, dass hier Kanäle des L-Typs für die Aufrechterhaltung sowie für die Frequenz des *pacemakings* von großer Bedeutung sind (Mercuri et al., 1994). Nach Blockade von spannungsabhängigen Natriumkanälen durch Tetrodotoxin (TTX), die zum Verschwinden der Aktionspotentiale und somit zum Erliegen des *pacemakings* führt, schwankt das Membranpotential weiter mit einer Frequenz, die mit der Schrittmacherfrequenz vergleichbar ist (Yung et al., 1991). Diese langsamen Oszillationen (slow oscillatory potentials, SOPs) wurden gemeinhin dafür verantwortlich gemacht, das Membranpotential näher an die Schwelle zu bringen und somit Aktionspotentiale zu triggern. Neuere Arbeiten zeigen, dass DHP-sensitive Kanäle am Schrittmacherprozess teilnehmen, nicht aber essentiell für dessen Aufrechterhaltung sind (Guzman et al., 2009). Wie weiter oben beschrieben finden sich im elektrophysiologischen Verhalten der Locus coeruleus-Neurone viele Gemeinsamkeiten mit dem der Zellen der SNpc (Abschnitt 4.3). Mithilfe von Experimenten mit dem L-Typ-Kalziumkanalblocker Isradipin soll im Folgenden geprüft werden, welche Rolle diese Kanäle für das pacemaking spielen und welche Unterschiede oder Gemeinsamkeiten der LC-Neurone zur SNpc nachzuweisen sind.

Eine erste Beobachtung bei den Experimenten mit Isradipin ist, dass sich durch die Applikation von Isradipin in die Messlösung ( $5\text{ }\mu\text{M}$ ) die spontane Aktivität der Locus coeruleus Neurone nicht blockieren lässt (Abb. 4.6, a,  $n = 6$ ). Weder kann hierdurch ein Sistieren der Aktionspotentiale noch eine Veränderung der AP-Frequenz erreicht werden.

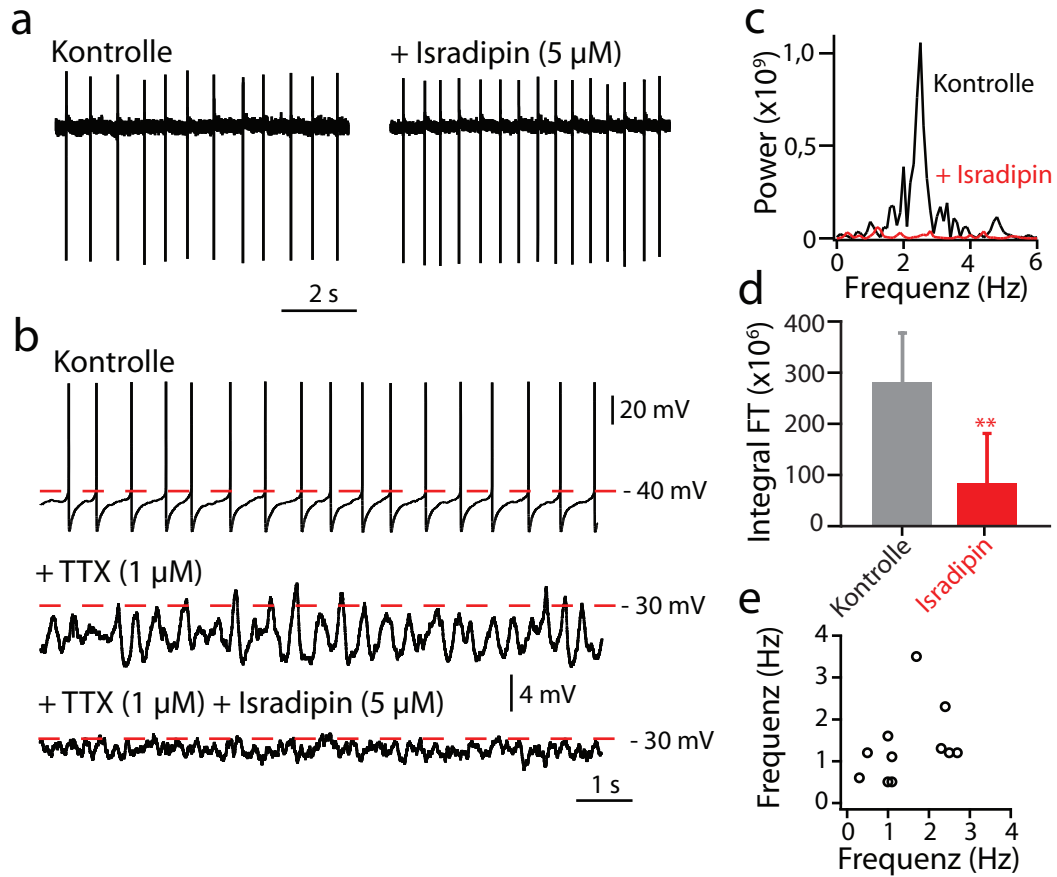


Bei elektrophysiologischen Messungen im *whole cell*-Modus kommt es nach kurzer Zeit zu einer Vermischung des Zellinneren mit der Pipettenlösung. Die sich dadurch veränderte Zusammensetzung des Zytoplasmas kann zu einem sog. *rundown*-Effekt führen. Ein etwaiger Effekt eines Pharmakons könnte dadurch verfälscht werden. Um diesen *rundown*-Effekt zu minimieren, wurde die Schrittmacheraktivität im *cell attached*-Modus gemessen. In Abbildung 4.6, a ist eine repräsentative Ableitung vor und nach der Applikation von Isradipin dargestellt. Ähnliche Ergebnisse wurden in allen sechs untersuchten Zellen beobachtet.

Dieses Verhalten der Zellen kann jedoch nicht auf eine fehlgeschlagene Antagonisierung von Isradipin auf Kalziumkanäle zurückgeführt werden, wie die nachfolgenden Experimente zeigen. Bei *whole cell*-Messungen war in Kontrollableitungen zunächst ein ähnliches Aktivitätsmuster wie in den vorherigen Messungen erkennbar (Abb. 4.6, b *oben*). Die Blockierung von spannungsabhängigen Natriumkanälen, die für den schnellen Aufstrich des Aktionspotentials verantwortlich sind, durch TTX führte erwartungsgemäß zu einem Verschwinden der APs. Die jetzt noch sichtbaren Potentialschwankungen sind mit den oben beschriebenen, durch Kalziumkanäle vermittelten „slow oscillatory potentials“ gleichzusetzen (Abb. 4.6, b *Mitte*). Dieselben Zellen wurden nach der Applikation von TTX in der Folge zusätzlich mit 5  $\mu$ M Isradipin superfundiert, wodurch die Oszillationen aufgehoben bzw. deutlich reduziert wurden (Abb. 4.6, b *unten*,  $n = 10$ ). Dieser Effekt kommt in Abbildung 4.6, c noch deutlicher zum Vorschein. Die Grafik zeigt die Spektralanalyse mittels Fourier-Transformation der Zelle aus Abbildung 4.6, b. Die Kontrollkurve in schwarz zeigt eine relativ regelmäßige Oszillation des Membranpotentials von etwa 2,2 Hz vor Applikation von Isradipin. Der peak bei dieser Frequenz ist unter Anwesenheit des Blockers nicht mehr nachweisbar (rote Kurve). Um die Reduktion der Oszillationen durch Isradipin statistisch bei allen untersuchten Zellen beurteilen zu können, wurde das Integral der Fourier-Funktionen vor und nach Isradipin-Applikation bei allen untersuchten Zellen berechnet und der Mittelwert gebildet. Abbildung 4.6, d zeigt die ermittelten Werte in einem Säulendiagramm. Es wird deutlich, dass es zu einer signifikanten Verringerung der Membranoszil-

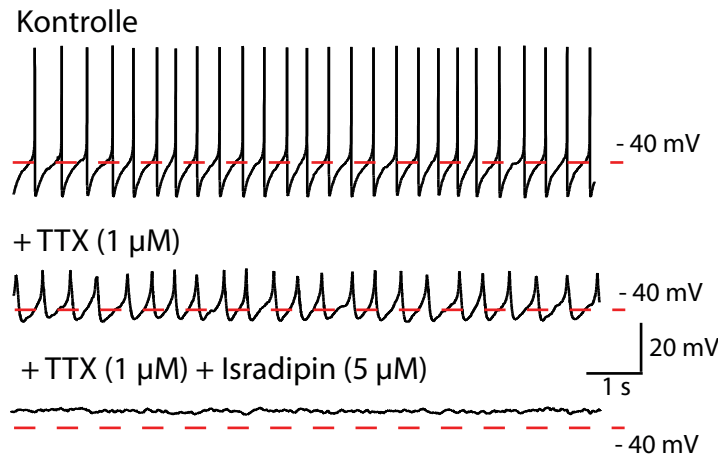
lationen durch die Blockade von L-Typ-Kalziumkanälen kommt (Integral vor Isradipin-Applikation:  $280,6 \pm 54,1$ ; Integral nach Isradipin-Applikation:  $84,8 \pm 8,9$  (jeweils  $\times 10^6$ ),  $p < 0,01$ ,  $n = 10$ ).

Statistisch bewegen sich die Schrittmacherfrequenzen und die Frequenz der Kalziumoszillationen der verschiedenen Zellen nach TTX-Applikation in einem vergleichbaren Rahmen. Ein erkennbarer Zusammenhang zwischen den beiden Frequenzen in ein und derselben Zelle besteht jedoch nicht (Abb. 4.6, e).



**Abbildung 4.6: Einfluss von Isradipin auf das pacemaking und SOPs.**

**a:** *cell attached*-Messung. Applikation von 5  $\mu\text{M}$  Isradipin hat keinen Einfluss auf die autonome Schrittmacheraktivität. **b:** *Oben:* *whole cell*-Kontrollmessung. Das Frequenzmuster ist vergleichbar mit den *cell attached*-Messungen. *Mitte:* Membranpotential nach Gabe von 1  $\mu\text{M}$  TTX.  $\text{Na}^+$ -unabhängige Membranoszillationen (SOPs) werden erkennbar. *Unten:* In Anwesenheit von 5  $\mu\text{M}$  Isradipin geht die Amplitude der Oszillationen deutlich zurück bzw. verschwindet ganz ( $n = 10$ ). **c:** Spektralanalyse der Membranoszillationen derselben Zelle mittels Fourier-Transformation. Aufgetragen ist die Power bei der jeweiligen Frequenz. Die Oszillationen sind durch Isradipin antagonisierbar. **d:** Die Funktionen der Fourier-Transformation wurden integriert und die untersuchten Zellen statistisch ausgewertet. Nach Gabe von Isradipin waren die Integrale signifikant kleiner als bei der Kontrolle ( $p < 0,01$ ). **e:** Zwischen der Frequenz des pacemakings und der der Oszillationen konnte kein signifikanter Zusammenhang nachgewiesen werden.

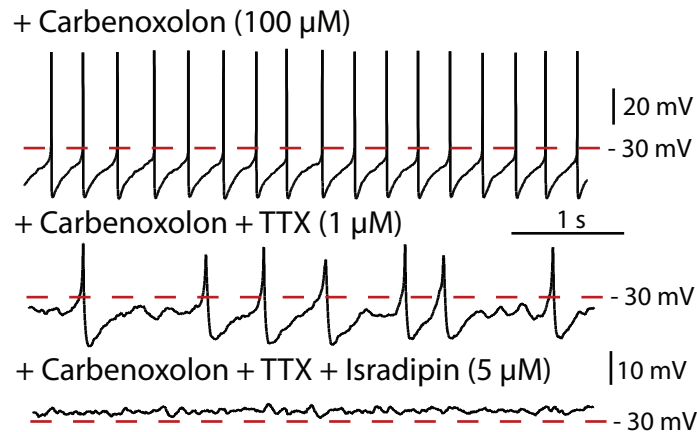


**Abbildung 4.7:**  $\text{Ca}^{2+}$ -spikes. *whole cell*-, *current clamp*-Messung, keine Strominjektion. Einige Zellen zeigten TTX-resistente spikes, die wiederum durch Isradipin antagonisierbar waren.

Bei einigen Zellen waren die Oszillationen derart stark ausgeprägt, dass man von regelrechten  $\text{Ca}^{2+}$ -spikes sprechen kann (Abb. 4.7). Dass auch diese Potentialveränderungen kalziumvermittelt sind, beweist das Ansprechen auf Isradipin.

Frühere Arbeiten zeigen eine starke Synchronität in der Aktivität von LC-Neuronen untereinander. Die Synchronität ist dabei sowohl bei den Schrittmachereigenschaften als auch bei den unterschwelligen Membranoszillationen nachweisbar (Christie et al., 1989; Ishimatsu and Williams, 1996; Alvarez et al., 2002) und wird durch die Kopplung der Neurone untereinander mit *gap junctions* erreicht („electrical coupling“).

Um die Rolle der elektrotonischen Kopplung für die intrinsische Schrittmacheraktivität der LC-Neurone zu untersuchen, wurden erste Voruntersuchungen mit dem *gap junction*-Blocker Carbenoxolon durchgeführt. Hierbei wurden elektrophysiologische Messungen im *whole cell*-Modus (*current clamp*, keine Strominjektion) vorgenommen. Diese Messungen zeigen, dass weder die intrinsische Schrittmacheraktivität noch die  $\text{Ca}^{2+}$ -Oszillationen von der Blockade der *gap junctions* durch Carbenoxolon ( $100 \mu\text{M}$ ) beeinflusst werden (Abb. 4.8,  $n = 3$ ). Diese Beobachtungen lassen vermuten, dass es sich bei den langsamen Membranoszillationen um intrinsische, in jeder Zelle vorhandene und nicht von einer Subpopulation von Neuronen im LC vorgegebene Vorgänge handelt.



**Abbildung 4.8: Membranoszillationen in Anwesenheit von Carbenoxolon.** *whole cell*-Messung, *current clamp*-Modus, keine Strominjektion. *Oben:* Kontrollmessung unter 100  $\mu\text{M}$  Carbenoxolon. Es ist kein Unterschied im Aktivitätsmuster dieser Zelle zu dem anderer Zellen ohne gap junction-Blocker zu erkennen. *Mitte:* Dieselbe Zelle zeigt nach TTX-Applikation starke Potentialschwankungen mit  $\text{Ca}^{2+}$ -spikes, die durch Isradipin antagonisierbar sind (*unten*).

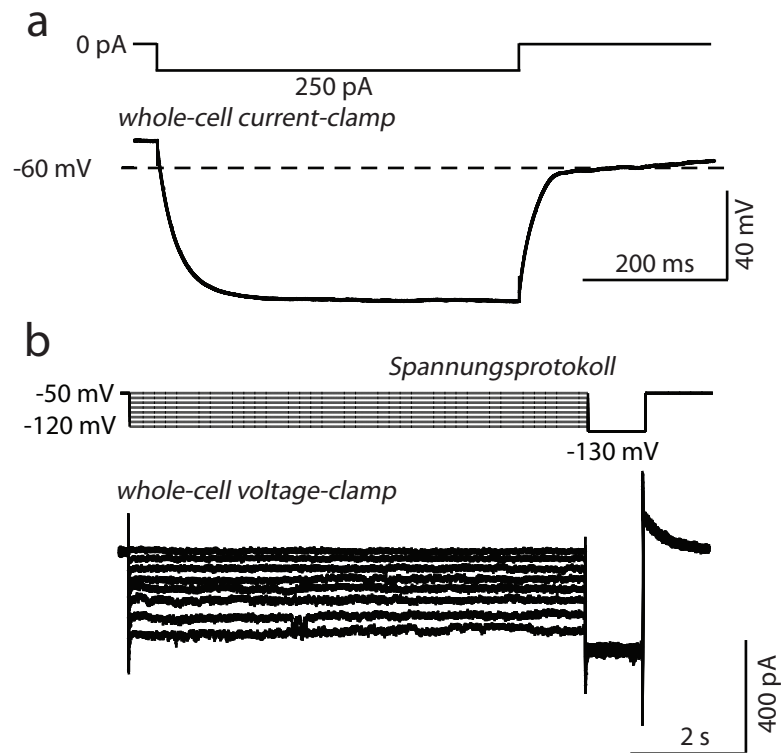
#### 4.5 HCN-Kanäle spielen keine Rolle für das pacemaking im Locus coeruleus

In dopaminergen SNpc-Neuronen sind neben anderen sowohl L-Typ-Kalziumkanäle als auch HCN-Kanäle („hyperpolarisation activated cyclic nucleotide gated“) am Schrittmacherprozess beteiligt. Nur wenn in den Zellen mindestens eine der beiden Komponenten aktiv – d.h. exprimiert und nicht geblockt – ist, kann eine spontane Aktivität beobachtet werden (Guzman et al., 2009).

Ogleich es – wie oben beschrieben – einige elektrophysiologische Gemeinsamkeiten der beiden Neuronengruppen gibt, kristallisiert sich bei der Untersuchung der HCN-Kanäle in LC-Neuronen ein Unterschied zu den Zellen der SNpc heraus. Neurone wie die der SNpc, in denen HCN-Kanäle exprimiert sind, zeigen in *current clamp*-Messungen einen sog. „*voltage-sag*“ als Reaktion

auf eine hyperpolarisierende Strominjektion. Bei diesem Phänomen folgt auf eine anfängliche Hyperpolarisation der Membran eine durch die Aktivierung von HCN-Kanälen vermittelte reaktive Depolarisierung, die man als *voltage-sag* bezeichnet. LC-Neurone hingegen weisen keinen *voltage-sag* auf (Abb. 4.9, a).

Auch *voltage clamp*-Messungen, mit denen ein durch HCN-Kanäle vermittelter Strom ( $I_h$ ) dargestellt werden kann, legen die Vermutung nahe, dass durch Hyperpolarisation gesteuerte Kanäle in LC-Neuronen keine Rolle spielen. Eine solche Messung ist in Abbildung 4.9, b dargestellt. Das Spannungsprotokoll beinhaltet eine prä-Puls-Phase, in der nacheinander von einem Haltepotential von -50 mV aus hyperpolarisierende Spannungssprünge beschrieben werden, und den eigentlichen Testpuls, bei dem das Potential auf -130 mV springt. An der in Abbildung 4.9, b gezeigten Stromkurve ist keinerlei Kinetik zu erkennen, die auf die Aktivierung eines Kanals schließen lässt; es sind vielmehr nur durch die passiven Eigenschaften der Zellmembran hervorgerufene Ströme sichtbar. Ein Vorhandensein von HCN-Kanälen bzw. deren Ströme in LC-Neuronen konnte somit nicht nachgewiesen werden.



**Abbildung 4.9: HCN-Kanäle spielen keine Rolle in LC-Neuronen.** **a:** *whole cell-, current clamp*-Messung mit einer hyperpolarisierenden Strominjektion (250 pA, 500 ms). Der Verlauf des Membranpotentials weist keinen *voltage-sag* auf. **b:** *whole cell-, voltage clamp*-Messung. Von einem Haltepotential von -50 mV wurden insgesamt sieben hyperpolarisierende Spannungssprünge um je 10 mV (Präpuls) angelegt mit anschließendem Sprung auf -130 mV (Testpuls). Der Stromverlauf der Membran zeichnet lediglich das abgebildete Spannungsprotokoll nach; es findet sich keine Aktivierungskinetik.

## 5 Diskussion

Die noradrenergen Neurone des Locus coeruleus (LC) sind autonome Schrittmacherzellen. Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, die molekularen Mechanismen, die dieser Schrittmacheraktivität zugrunde liegen, näher zu beleuchten. Da insbesondere Kalzium neben seiner elektrophysiologischen Funktion auch eine große Rolle in der Entwicklung der mitochondrialen Dysfunktion spielt und damit unmittelbar Einfluss auf das Überleben der Zelle nimmt, wurde ein besonderes Augenmerk auf Kalziumkanäle des L-Typs gelegt.

Auch gerade in Anbetracht der großen Relevanz des LC für Pathogenese und Progression der Parkinson-Krankheit sind die Untersuchungen des Schrittmachermechanismus von Interesse. Da sowohl die Substantia nigra pars compacta (SNpc) als auch der LC im Verlauf der Krankheit einem neuropathologisch deutlich sichtbaren Zellverlust unterliegen, liegt die Vermutung nahe, dass auf zellulärer Ebene Gemeinsamkeiten zwischen diesen beiden Kerngebieten existieren. Etwaige Parallelen in den elektrophysiologischen Eigenschaften von SNpc und LC könnten Hinweise darauf geben, warum gerade diese Zellgruppen von einer beschleunigten Degeneration betroffen sind und eine höhere Vulnerabilität gegenüber Parkinson-auslösenden Toxinen besitzen.

Im Folgenden werden die oben beschriebenen Ergebnisse in den aktuellen Stand der Forschung eingeordnet und deren Relevanz und Bedeutung diskutiert.

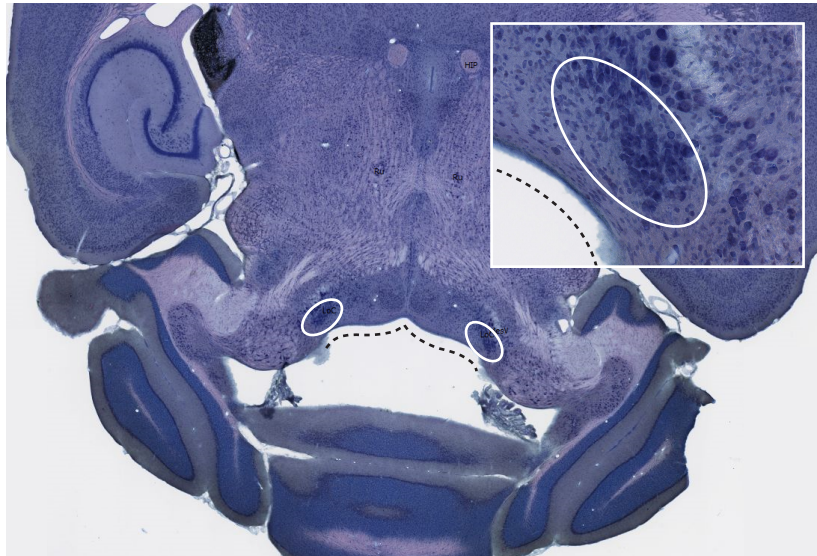


## 5.1 Identifizierung der LC-Neurone

Eine sinnvolle Bewertung der Ergebnisse ist nur möglich, sofern die sichere Identifizierung der Zellen als LC-Neurone gewährleistet ist. Die Auswahl der Hirnschnitte, die mutmaßlich Zellen des LC enthalten, und das Auffinden der richtigen Region im Schnitt selbst sind nicht trivial, da der LC im Gehirn einer Maus eine maximale Ausdehnung von ca. 400  $\mu\text{m}$  hat und somit lediglich ein, vereinzelt auch zwei Schnitte pro Hirn für Experimente verwendet werden können. Um dennoch die richtigen Zellen auszumachen, wurden vier Kriterien zur Identifizierung herangezogen: die anatomische Lage, die Zellmorphologie, die Expression von Schlüsselenzymen und das elektrophysiologische Profil der LC-Neurone. Diese vier Kriterien werden im Folgenden näher analysiert.

### 5.1.1 Anatomie

Als anatomische Landmarke wurde der Rand des vierten Ventrikels verwendet. In der entsprechenden Schnitthöhe präsentiert sich die Begrenzung des Ventrikels in einer charakteristischen Form (vgl. Abb. 5.1). Der Locus coeruleus stellt sich als eine Gruppe von dicht beieinander liegenden, großen, ovalen Zellkörpern dar.



**Abbildung 5.1: LC-enthaltender, horizontaler Hirnschnitt.** Der LC zeigt sich als Region mit dicht aneinander liegenden relativ großen Zellkörpern (Kreise). Die gestrichelte Linie zeigt den auf der entsprechenden Schnitthöhe charakteristisch geformten Rand des vierten Ventrikels, der an eine geschweifte Klammer erinnert (modifiziert nach brainmaps.org).

Um diese anatomische Bestimmung zu untermauern, wurde anfänglich mit genetisch veränderten Mäusen gearbeitet, bei denen das Enzym Tyrosinhydroxylase mit einem fluoreszierenden Farbstoff („green fluorescent protein“, GFP) gekoppelt ist. Somit ist in diesen Mäusen in sämtlichen Katecholaminproduzierenden Zellen – also auch in noradrenergen LC-Neuronen – GFP exprimiert, was zur Folge hat, dass sie bei Anregung durch UV-Licht fluoreszieren. Bei der Untersuchung der interessierenden Hirnschnitte zeigte sich eine deutlich abgrenzbare Fluoreszenz im vorher lichtmikroskopisch als Locus coeruleus identifizierten Areal.

### 5.1.2 Zellmorphologie

Im nächsten Schritt wurde die Morphologie der Zellen untersucht, wobei Größe und Form der Somata sowie die Anzahl der dendritischen Verzweigungen beurteilt wurden. Travagli et al. fanden in LC-Neuronen der Ratte eine durch-

schnittliche Dendritenanzahl von  $15,1 \pm 0,07$  und eine Zellkörpergröße von  $25 \pm 3 \mu\text{m}$  (Travagli et al., 1996). Bei den in dieser Arbeit untersuchten Zellen konnten 13, 15 bzw. 16 Dendriten gezählt werden; die Größe der Somata betrug 19, 21 bzw.  $24 \mu\text{m}$ . Die untersuchten Zellen lagen sowohl im Hinblick auf die Dendritenanzahl als auch auf die Größe der Somata in der gleichen Größenordnung wie die bei Travagli et al. beschriebenen Zellen.

Der Vergleich morphologischer Daten zweier unterschiedlicher Spezies muss prinzipiell vorsichtig angegangen werden, da die Vergleichbarkeit zwischen Maus und Ratte nicht zwingend gegeben sein muss. Über die Zellmorphologie von LC-Neuronen der Maus ist bisher weit weniger bekannt als über die der Ratte. Allgemein kann aber festgehalten werden, dass sich LC-Neurone in beiden Tierarten als Zellen mit vergleichsweise großen Somata darstellen. Die morphologischen Parameter stimmen somit weitgehend überein und auch die Anordnung und Lokalisation der Zellen sind bei beiden Tieren vergleichbar. Dies macht die korrekte Identifizierung der Zellen als LC-Neurone sehr wahrscheinlich.

### 5.1.3 Expression von Schlüsselenzymen

In der molekularbiologischen Untersuchung waren vor allem die Schlüsselenzyme der Noradrenalin synthese, Tyrosinhydroxylase (TH) und Dopamin- $\beta$ -Hydroxylase (DBH) von Interesse. Neurone, die die mRNA dieser beiden Enzyme exprimieren, müssen folglich noradrenalinproduzierende Zellen sein. Aus den in dieser Arbeit gezeigten molekularbiologischen Untersuchungen geht hervor, dass in sieben von zehn untersuchten Zellen sowohl TH als auch DBH exprimiert wird.

Als Grund dafür, dass nicht alle Zellen TH- und DBH-positiv gemessen wurden, ist prinzipiell denkbar, dass innerhalb der morphologisch gleich erscheinenden Population der LC-Neurone weitere Subpopulationen von nicht-noradrenergen Zellen existieren. Unter dieser Annahme wäre es wahrscheinlich, dass auch

bei der Betrachtung der elektrophysiologischen Ergebnisse Unterschiede beobachtet und die Bewertung derer somit differenzierter vorgenommen werden müsste. Um diese Theorie zu überprüfen, wurden von jeder molekularbiologisch untersuchten Zelle Ableitungen gemacht, um deren Aktivitätsmuster bestimmen und mit den übrigen Messungen vergleichen zu können (Daten nicht gezeigt). Die Tatsache, dass keine dieser Zellen Variationen im elektrophysiologischen Verhalten zeigte, macht die Möglichkeit, unterschiedliche Zellpopulationen untersucht zu haben, unwahrscheinlich.

Generell ist auch denkbar, dass die zu untersuchende mRNA beim Aspirieren des Zellinhaltes in die Pipette Schaden genommen hat und somit nicht mehr nachweisbar ist.

Eine weitere mögliche Ursache für den fehlenden Expressionsnachweis in den drei Zellen ist in der Methode des Experiments zu suchen. Um das Substrat für die PCR zu gewinnen, wurde der Zellinhalt nach der Ableitung durch Anlegen von Unterdruck in das Innere der Patch-Pipette gezogen. Da die Neurone direkt aus dem Hirnschnitt gesammelt wurden, mussten sie unter lichtmikroskopischer Kontrolle aus ihrem Zellverband gelöst werden. Dabei ist es aufgrund der eingeschränkten Sichtverhältnisse im slice nahezu unmöglich, mit Sicherheit beurteilen zu können, ob das Zellinnere tatsächlich komplett in die Pipettenspitze aufgenommen wurde. Die Annahme, dass der Grund für das vereinzelte Fehlen der entsprechenden Banden in der Gelelektrophorese, also bei der Methodik dieser Experimente zu suchen ist und nicht von der fehlenden Expression der Enzyme in den Zellen herrührt, erscheint angesichts dieser Überlegungen wahrscheinlich.

### 5.1.4 Elektrophysiologisches Profil

Bei dem Vorhaben, die korrekten Locus coeruleus Neurone zu identifizieren, sollten die elektrophysiologischen Eigenschaften der Zellen näher beleuchtet werden. Besonders der Vergleich der in dieser Arbeit gemessenen Ergebnisse

mit schon bekannten Messergebnissen sollte die Identifizierung einen Schritt weiter bringen.

Es zeigt sich, dass die in dieser Arbeit erhobenen elektrophysiologischen Parameter weitgehend mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen vergleichbar sind. Die spontane Entladungsrate der Neurone liegt mit 0,8-3,8 Hz in dem Bereich, der bereits sowohl in der Maus (de Oliveira et al., 2010; Zhang et al., 2010), als auch in der Ratte (Williams et al., 1984; Williams and Marshall, 1987; Christie et al., 1989; Alreja and Aghajanian, 1991; Ishimatsu and Williams, 1996) beobachtet werden konnte. Die Beobachtungen bezüglich Amplitude und Morphologie der Aktionspotentiale entsprechen denen von de Oliveira et al. und Zhang et al..

In der Zusammenschau der in diesem Kapitel dargelegten Ergebnisse erscheint die korrekte Identifikation der gemessenen Zellen als Locus coeruleus Neurone gesichert.

## **5.2 Vergleich Substantia nigra pars compacta und Locus coeruleus**

In der Pathogenese der Parkinson-Krankheit spielt neben der Substantia nigra pars compacta (SNpc) auch der Locus coeruleus eine entscheidende Rolle. Genau wie SNpc-Neurone unterliegen auch die Zellen des LC einer beschleunigten Degeneration. Die Gründe für das frühzeitige Absterben dieser Zellen ist nach wie vor ungeklärt. Ein Ziel dieser Arbeit ist es, mögliche Parallelen im elektrophysiologischen Verhalten der beiden Zellpopulationen herauszuarbeiten. Gemeinsamkeiten im Mechanismus der Schrittmacheraktivität könnten einen Hinweis auf etwaige Mechanismen geben, die der erhöhten Vulnerabilität der betroffenen Nervenzellen zugrunde liegen.

Zunächst fällt auf, dass - wie in Abschnitt 4.5 gezeigt - HCN-Kanäle in Locus coeruleus Neuronen keine funktionale Rolle spielen, das heißt, die Schrittmacheraktivität dieser Zellen ist nicht auf den Beitrag von HCN-Kanälen ange-

wiesen. Dieser Umstand stellt einen fundamentalen Unterschied zwischen den beiden Zellpopulationen dar. In SNpc-Neuronen ist zweifellos ein funktionaler Strom durch HCN-Kanäle vorhanden (Chan et al., 2007) und auch das pace-making ist jedenfalls zum Teil von diesen Kanälen abhängig (Guzman et al., 2009). Zwar ist in SNpc-Neuronen der alleinige Block von HCN-Kanälen nicht ausreichend, um die Schrittmacheraktivität der Zellen zum Erliegen zu bringen; auch die isolierte Blockade von L-Typ-Kalziumkanälen bringt hier kein Sistieren der Aktionspotentiale mit sich. Die Kombination der beiden Blockaden jedoch führt in der Substantia nigra zu einem Ausfall jeglicher autonomer Aktivität (Guzman et al., 2009). Die Schrittmacheraktivität in der SNpc ist also gegenüber Blockaden einzelner Kanalsysteme stabil, anders als dies in anderen autonom aktiven Zellen (wie z.B. den Schrittmacherzellen des Herzens) der Fall ist. Die Blockierung einer der beiden Kanalsysteme scheint von dem jeweils anderen kompensiert werden zu können.

Die alleinige Blockierung von L-Typ-Kalziumkanälen bringt auch in Locus coeruleus Neuronen das pacemaking nicht zum Erliegen, wie in Abschnitt 4.4 gezeigt wird. Da in Locus coeruleus Neuronen eine Beteiligung der HCN-Kanäle am Schrittmachermechanismus fehlt, ist hier die Kompensation durch das HCN-System, wie es in SNpc-Neuronen beobachtet werden kann, nicht möglich. Vor diesem Hintergrund stellt sich die Frage, welche anderen (hier nicht untersuchten) Leitfähigkeiten der LC-Neurone für die Schrittmacheraktivität verantwortlich sein könnten. Ein möglicher, von HCN-Kanälen unabhängiger Mechanismus beruht auf der Kinetik von kalziumabhängigen Kaliumkanälen. Das während des Aktionspotentials einfließende Kalzium bewirkt ein Öffnen dieser Kanäle, das zu einer Nachhyperpolarisation der Zellmembran führt. Der nach Ende des vorangegangenen Aktionspotentials wieder sinkende intrazelluläre Kalziumspiegel führt während des AP-freien Intervalls zum Schließen der Kaliumkanäle, das wiederum die Depolarisation der Zellmembran nach sich zieht. Sobald die Membran so weit depolarisiert ist, dass sie den Schwellenwert erreicht, wird ein neues AP ausgelöst. Um den genauen Mechanismus, der der Schrittmacheraktivität der LC-Neurone zugrunde liegt, aufzuklären, wäre somit die Untersuchung von kalziumabhängigen Kaliumkanälen

von Interesse. Sowohl der molekularbiologische Nachweis der Expression des entsprechenden Proteins als auch die elektrophysiologische Charakterisierung des entsprechenden Stroms wären denkbare weiterführende Experimente.

Eine Gemeinsamkeit der beiden Zellpopulationen von SNpc und LC ist das Auftreten von Membranoszillationen (SOPs), die nach Blockade der Aktionspotentiale durch TTX sichtbar werden (vgl. Abschnitt 4.4 bzw. Chan et al. (2007)). Wie in den Neuronen der SNpc sind auch die Oszillationen der LC-Zellen kalziumvermittelt, was durch das Ansprechen auf das Dihydropyridin Isradipin ( $5\text{ }\mu\text{M}$ ) deutlich wird. Gemeinsam ist beiden Zelltypen auch, dass die alleinige Gabe von Isradipin in gleicher Konzentration die autonome Aktivität der Neurone nicht beeinflusst (vgl. Abschnitt 4.4 bzw. Guzman et al. (2009)).

Weitere Parallelen sind im Frequenzmuster der intrinsischen Aktivität sowie in der Morphologie der Aktionspotentiale zu finden (vgl. Abschnitte 4.3.1 und 4.3.2 bzw. Chan et al. (2007) und Bean (2007)).

### 5.3 Kalziumhomöostase und Oxidativer Stress

Warum Zellen der Substantia nigra, des Locus coeruleus und anderer Kerngebiete im Gehirn im Verlauf der Parkinson-Krankheit einem beschleunigten Zelluntergang unterliegen, ist nach wie vor nicht vollständig verstanden. Während bei genetisch (Kumar et al., 2011) oder toxisch (van der Mark et al., 2012) bedingten Parkinson-Syndromen die Ursachen weitgehend erforscht sind, werden beim IPS verschiedene ätiologische Modelle diskutiert. Das in Abschnitt 2.4 beschriebene Modell zum Einfluss oxidativen Stresses ist ein möglicher Erklärungsansatz für die erhöhte Vulnerabilität der betroffenen Zellgruppen.

Guzman et al. haben kürzlich für SNpc- und VTA-Neurone mithilfe von transgenen Mäusen die Belastung einzelner Zellen durch oxidativen Stress nachweisen können. In den Experimenten wurden Mäuse verwendet, die ein Genprodukt bestehend aus einem redoxsensitiven „green fluorescent protein“

(GFP) gekoppelt an den Promotor für Tyrosinhydroxylase exprimieren. Mittels Zweiphotonen-Mikroskopie wurde der Oxidationsstatus der Zellen gemessen. Es zeigte sich, dass Zellen in der SNpc im Vergleich zu denen der VTA von Grund auf einem höheren oxidativen Stress ausgesetzt sind. Eine Vorbehandlung der Mäuse mit Isradipin bewirkte eine signifikante Minderung des oxidativen Stresses (Guzman et al., 2010). Diese Beobachtungen unterstützen die oben beschriebene These des schädigenden Einflusses einer Kalziumüberladung der Zellen. Vergleichbare Messungen an LC-Neuronen könnten Auskunft darüber geben, ob auch hier prinzipiell ein Ansatz zur neuroprotektiven Behandlung gegeben ist.

Verschiedene Arbeiten, die sich ebenfalls mit dem Zusammenhang zwischen intrazellulärem Kalziumspiegel und Überlebensrate dopaminerger Zellen befassen, stehen in scheinbarem Widerspruch zu dem oben beschriebenen Konzept. Die hier durchgeführten Experimente führen zu dem Ergebnis, dass ein moderater Anstieg des intrazellulären Kalziumspiegels und die elektrische Aktivität der Zellen zu einer erhöhten Überlebensrate führen (Salthun-Lassalle et al., 2004; Katsuki et al., 2001; Michel et al., 2007). Eine mögliche Erklärung für diese unterschiedlichen Beobachtungen ist die Tatsache, dass hier mit kultivierten dopaminergen Zellen aus dem Mittelhirn von Ratten und nicht mit Hirnschnitten gearbeitet wurde. Angesichts der stark differierenden Ergebnisse, die in der Literatur zu finden sind, muss davon ausgegangen werden, dass der Einfluss von elektrischer Aktivität und Höhe des Kalziums auf das Überleben der Zellen stark von der Art und den Rahmenbedingungen der jeweiligen Experimente abhängt. Auch scheint der positive Effekt der Kalziumerhöhung auf einen schmalen Konzentrationsbereich beschränkt zu sein (Salthun-Lassalle et al., 2004). In den von Guzman et al. durchgeführten Experimenten wird der Redoxstatus der Zellen abhängig von der Blockade von L-Typ-Kalziumkanälen gemessen und nicht der Einfluss des Blockers auf die Konzentration von Kalzium im Zytoplasma, sodass keine eindeutige Aussage über die Bedeutung der intrazellulären Kalziumkonzentration an sich getroffen werden kann.



## 5.4 Neuroprotektion und klinischer Bezug

Das in Abschnitt 2.4 beschriebene Modell zusammen mit den in Abschnitt 4.4 gezeigten Ergebnissen demonstriert die potentielle Bedeutung einer Blockade von Kalziumkanälen für die Behandlung der Parkinson-Krankheit. Auf die autonome Schrittmacheraktivität bzw. die Frequenz der Aktionspotentiale der Locus coeruleus Neurone hat die Applikation des L-Typ-Kalziumkanalblockers Isradipin keine Wirkung. Das Ansprechen der nach TTX-Applikation sichtbaren langsamen Membranoszillationen auf das Dihydropyridin zeigt aber, dass diese Kanäle dennoch in diesen Zellen aktiv sind. Das bedeutet, dass L-Typ-Kalziumkanäle zwar an der elektrischen Aktivität der Neurone beteiligt, für diese aber nicht zwingend notwendig sind. Wenn durch die Blockade dieser Kanäle tatsächlich die intrazelluläre Kalziumkonzentration und damit auch der oxidative Stress der Zellen reduziert werden kann, hätten Dihydropyridine potentiell neuroprotektiven Charakter auf LC-Neurone und dies, ohne die Funktion der Zellen zu beeinflussen.

Da Dihydropyridine schon seit Jahrzehnten erfolgreich in der Behandlung der arteriellen Hypertonie eingesetzt werden und relativ nebenwirkungsarm sind, stellen sie vor dem hier beschriebenen Hintergrund eine interessante Möglichkeit einer neuen neuroprotektiven Strategie dar. Eine erste klinische Pilotstudie an 31 Parkinson-Patienten hat gezeigt, dass die Einnahme von Isradipin keinen signifikanten Effekt auf den Blutdruck hat. Das Medikament wurde in dieser Studie sehr gut toleriert; lediglich bei höheren Dosierungen traten Nebenwirkungen wie Beinödeme oder Schwindel auf (Simuni et al., 2010).

Die Annahme, dass der oben beschriebene Mechanismus zumindest in Neuronen der SNpc vorzufinden ist, wird durch retrospektive klinische Studien unterstützt, die die Inzidenz der Parkinson-Krankheit bei Patienten, die aufgrund einer arteriellen Hypertonie medikamentös behandelt werden, untersuchen. Hierbei findet sich bei denjenigen Patienten, die eine langjährige Behandlung mit Dihydropyridinen erhalten haben, eine signifikant niedrigere Inzidenz der Erkrankung als in den anderen Gruppen (Rodnitzky, 1999; Becker et al., 2008; Ritz et al., 2010; Pasternak et al., 2012). Dieser Umstand

legt nahe, dass L-Typ-Kalziumkanalblocker einen neuroprotektiven Effekt auf die Substantia nigra haben.

Verschiedene andere Studien kommen zu einem entgegengesetzten Ergebnis. Ton et al. untersuchten in einer Fall-Kontroll-Studie ebenfalls die Inzidenz der Parkinson-Krankheit in Abhängigkeit von der Einnahme von Kalziumkanalantagonisten und fanden keine signifikante Korrelation (Ton et al., 2007). Im Unterschied zu der oben genannten Studie von Becker et al. wurde hier die Einnahme von Kalziumblockern im Zeitraum von fünf Jahren vor Untersuchungsbeginn außer Acht gelassen, um den Einfluss der Medikation während der subklinischen Phase der Erkrankung auszuschließen. Die größte Risikoreduktion ist nach Becker et al. aber offensichtlich in den Gruppen erkennbar, die noch in den 90 Tagen vor Diagnosestellung Kalziumantagonisten eingenommen haben. Eine Einnahme in der Vergangenheit hat in beiden Studien keinen Effekt gezeigt. Dieser Umstand könnte die divergierende Grundaussage der beiden Arbeiten erklären.

Neben klinischen Studien weisen auch histopathologische Untersuchungen an Hirnschnitten von Mäusen auf einen protektiven Effekt von Isradipin auf das Überleben von SNpc-Neuronen in einem Mausmodell für Parkinson (6-Hydroxydopamin, 6-OHDA) hin (Ilijic et al., 2011). Inwieweit der Antagonismus von L-Typ-Kalziumkanälen auch im Locus coeruleus eine positive Wirkung auf das Überleben der Neurone hat, muss sich in Folgeexperimenten zeigen. Sinnvoll wären hier zum Beispiel immunhistologische Untersuchungen von TH-positiven Zellen in Hirnschnitten von Mäusen, die mit Dihydropyridinen vorbehandelt wurden, im Vergleich zu solchen, die diese Behandlung nicht erfahren haben. In einem Mausmodell für Parkinson (6-OHDA, MPTP) könnte bei positivem Ausgang in den vorbehandelten Tieren eine höhere Zahl an LC-Neuronen gemessen werden als in der Kontrollgruppe.

Substanzen, denen eine neuroprotektive Komponente zugesprochen wird, sind für die Behandlung der Parkinson-Krankheit prinzipiell vor allem dann von Bedeutung, wenn sie möglichst früh eingesetzt werden können, da bei Manifestierung der klinischen Symptome bereits über 70 % der dopaminergen SNpc-

Neurone zugrunde gegangen sind. Insofern hat die Entwicklung von Strategien zur Früherkennung der Krankheit in Zukunft eine große Bedeutung. Auch bei Kalziumantagonisten ist der frühe, präklinische Einsatz essentiell, da unlängst gezeigt werden konnte, dass Dihydropyridine auf das Fortschreiten der Erkrankung keinen Einfluss zu haben scheinen (Marras et al., 2012).

## 6 Anhang

### 6.1 Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren die Damen/Herren...

... in Marburg

Adamkiewicz, Aumüller, Barth, Bartsch, Basler, Baum, Becker, Bien, Cetin, Czubayko, Daut, Decher, Del Rey, Donner-Banzhoff, Eggert, Fendrich, Feuer, Geks, Gerdes, Glorius, Görg, Gress, Hamer, Hertl, Höffken, Hofmann, Höglinger, Hoyer, Kann, Kill, Klose, König, Koolmann, Langer, Lill, Liss, Löffler, Lohoff, Maisch, Mandrek, Mittag, Moll, Moosdorf, Müller, Neubauer, Nimphius, Oertel, Opitz, Pagenstecher, Plant, Rausch, Renz, Richter, Röhm, Röper, Rosenow, Rothmund, Ruchholtz, Schade, Schäfer, Seitz, Steiniger, Tackenberg, Vogelmeier, Voigt, Waldegger, Weihe, Wennemuth, Werner, Westermann, Wulf

... in Chicago

Chan, Day, Gertler, Guzman, Ilijic, Mugnaini, Peterson, Plotkin, Sanchez, Sebel, Surmeier, Ulrich

## 6.2 Danksagung

Zuerst möchte ich mich bei Prof. Dr. Niels Decher bedanken, der mir die Möglichkeit gegeben hat, in seiner Arbeitsgruppe zu promovieren. Für seine Unterstützung während meiner Laborarbeit in Marburg und Chicago, das E-Phys-Training, die Mittwoch-Abend-Stammtische und vieles mehr bin ich sehr dankbar. Außerdem danke ich ihm für die Begutachtung dieser Arbeit.

Ich möchte mich bei Prof. Dr. W. H. Oertel bedanken, dem ich nicht nur meinen Forschungsaufenthalt in den USA zu verdanken habe. Ohne seine Begeisterung für das Projekt wäre mir diese großartige Erfahrung nicht zuteil geworden.

Außerdem bin ich Prof. Dr. D. J. Surmeier sehr dankbar für die Gelegenheit, ein halbes Jahr in seinem Labor arbeiten zu dürfen. Von ihm habe ich sehr viel – nicht nur über die wissenschaftliche Welt – gelernt.

Meinem Freund und Labor-Kollegen Michael Netter bin ich ganz besonders dankbar. Er ist zu einem großen Teil für meine Begeisterung für die Physiologie verantwortlich und hat mich in die Arbeitsgruppe geholt. Außerdem war er über viele Jahre Ansprechpartner für jegliche Art von Fragen und ein guter Freund. Außerdem danke ich ihm für das sorgfältige und konstruktive Korrekturlesen dieser Arbeit.

Besonders danken möchte ich Charlotte Reda, die mir in der heißen Phase der Schreibarbeit stets Unterstützung und Verständnis entgegengebracht und mir in den richtigen Momenten den Blick fürs Wesentliche wiederverschafft hat. Außerdem hat sie auf zuverlässigste und akribischste Weise diese Arbeit gelesen und korrigiert.

Großer Dank gebührt den Kollegen des physiologischen Instituts: Dr. Anne-Kathrin Streit, die mir immer mit Rat und Tat zur Seite stand, mich zu meinen ersten Patch-Gehversuchen gebracht und selbst beim Schreiben immer wieder geholfen hat; Stefanie Marzian und Konstantin Wemhöner für ihre ständige Hilfsbereitschaft; Günter Schlichthörl für seine wertvolle technische Unterstützung; Robert Graf und Kersten Schneider aus der feinmechanischen Werkstatt für die erstklassige Zusammenarbeit beim Messstand-Aufbau.

Abschließend möchte ich mich ganz besonders bei meiner Familie bedanken. Meine Eltern Andreas und Karin und meine Schwester Julia waren immer für mich da und haben mich bedingungslos unterstützt. Familie ist das wichtigste auf der Welt – und ich habe mit meiner riesiges Glück. Danke!

## Abbildungsverzeichnis

2.1	Medikamentöse Therapie bei der Parkinson-Krankheit . . . . .	13
2.2	Anatomie des Locus coeruleus . . . . .	16
2.3	Noradrenalinsynthese . . . . .	18
2.4	Spannungsabhängige Kalziumkanäle . . . . .	21
2.5	Untereinheiten eines $\text{Ca}_v1$ -Kanals . . . . .	23
2.6	Schematische Darstellung eines L-Typ-Kalziumkanals . . . . .	24
2.7	Schematische Darstellung des Modells zur Erklärung von erhöhter ROS-Exposition von autonomen Neuronen . . . . .	27
3.1	Patch-Clamp-Messplatz . . . . .	32
3.2	PCR-Protokoll . . . . .	36
4.1	Locus coeruleus-Neuron, konfokal-mikroskopische Aufnahme . .	38
4.2	Expression von TH und DBH . . . . .	40
4.3	Expression von $\text{Ca}_v1.3$ . . . . .	40
4.4	Schrittmacheraktivität der LC-Neurone . . . . .	42
4.5	Morphologie der Aktionspotentiale . . . . .	43
4.6	Einfluss von Isradipin auf das pacemaking und SOPs . . . . .	47
4.7	$\text{Ca}^{2+}$ -spikes . . . . .	48
4.8	Membranoszillationen in Anwesenheit von Carbenoxolon . . . .	49
4.9	Rolle der HCN-Kanäle in LC-Neuronen . . . . .	51
5.1	LC-enthaltender Hirnschnitt . . . . .	54

## Abkürzungsverzeichnis

6-OHDA	6-Hydroxydopamin
ACSF	‘artificial cerebrospinal fluid’ (künstlicher Liquor)
AP	Aktionspotential
bp	Basenpaare
CC	‘citric cycle’ (Zitratzyklus)
cDNA	komplementäre DNA, Desoxyribonukleinsäure
COMT	Catechol-O-Methyl-Transferase
DBH	Dopamin- $\beta$ -Hydroxylase
DBS	‘deep brain stimulation’ (Tiefe Hirnstimulation)
DHP	Dihydropyridin
GABA	$\gamma$ -Aminobuttersäure
GFP	‘green fluorescent protein’ (grün fluoreszierendes Protein)
HCN	hyperpolarisation activated cyclic nucleotide gated
HVA	‘high voltage activated’
Hz	Hertz
IS	initiales Segment (eines Neurons)
L-Dopa	Levodopa, L-3,4-Dihydroxyphenylalanin
LC	Locus coeruleus
LVA	‘low voltage activated’
MAO <sub>B</sub>	Monoaminoxidase B
MPTP	1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridin
mRNA	messenger RNA, Ribonukleinsäure
NA	Noradrenalin



NCX	.....	Na <sup>+</sup> /Ca <sup>2+</sup> -Austauscher
NMDA	.....	N-Methyl-D-Aspartat
PBS	.....	‘phosphate buffered saline’ (phosphatgepufferte Salzlösung)
ROS	.....	‘reactive oxygen species’ (Reaktive Sauerstoffspezies)
scRT-PCR	.....	‘single cell-reverse transcription-PCR’
SD	.....	somato-dentritischer Bereich (eines Neurons)
SNpc	.....	Substantia nigra pars compacta
SOP	.....	‘slow oscillatory potentials’ (langsame Membranoszillationen)
STN	.....	Nucleus subthalamicus
TH	.....	Tyrosinhydroxylase
TTX	.....	Tetrodotoxin
VDAC	.....	‘voltage dependent anion channels’ (spannungsabhängige Anionenkanäle)
VTA	.....	ventrales tegmentales Areal
ZNS	.....	Zentrales Nervensystem

## Literaturverzeichnis

Alreja M, Aghajanian GK (1991) Pacemaker activity of locus coeruleus neurons: whole-cell recordings in brain slices show dependence on cAMP and protein kinase A. *Brain Research* 556:339–43.

Alvarez Va, Chow CC, Van Bockstaele EJ, Williams JT (2002) Frequency-dependent synchrony in locus ceruleus: role of electrotonic coupling. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:4032–6.

Arnsten AF, Goldman-Rakic PS (1984) Selective prefrontal cortical projections to the region of the locus coeruleus and raphe nuclei in the rhesus monkey. *Brain Research* 306:9–18.

Aston-Jones G, Ennis M, Pieribone Va, Nickell WT, Shipley MT (1986) The brain nucleus locus coeruleus: restricted afferent control of a broad efferent network. *Science* 234:734–7.

Aston-Jones G (2005) Brain structures and receptors involved in alertness. *Sleep Med* 6 Suppl 1:S3–7.

Bean BP (1984) Nitrendipine block of cardiac calcium channels: high-affinity binding to the inactivated state. *Proc Natl Acad Sci USA* 81:6388–92.

Bean BP (2007) The action potential in mammalian central neurons. *Nat Rev Neurosci* 8:451–65.

Becker C, Jick SS, Meier CR (2008) Use of antihypertensives and the risk of Parkinson disease. *Neurology* 70:1438–44.

Benarroch EE (2009) The locus ceruleus norepinephrine system: functional organization and potential clinical significance. *Neurology* 73:1699–704.

- Berridge CW (2008) Noradrenergic modulation of arousal. *Brain Res Rev* 58:1–17.
- Berridge CW, Schmeichel BE, España RA (2012) Noradrenergic modulation of wakefulness/arousal. *Sleep Med Rev* 16:187–97.
- Berridge CW, Waterhouse BD (2003) The locus coeruleus-noradrenergic system: modulation of behavioral state and state-dependent cognitive processes. *Brain Res Rev* 42:33–84.
- Biel M, Hullin R, Freundner S, Singer D, Dascal N, Flockerzi V, Hofmann F (1991) Tissue-specific expression of high-voltage-activated dihydropyridine-sensitive L-type calcium channels. *Eur J Biochem* 200:81–8.
- Braak H, Ghebremedhin E, Rüb U, Bratzke H, Del Tredici K (2004) Stages in the development of Parkinson’s disease-related pathology. *Cell Tissue Res* 318:121–34.
- Catterall WA (2000) Structure and regulation of voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channels. *Annu Rev Cell Dev Biol* 16:521–55.
- Catterall WA, Striessnig J, Snutch TP, Perez-Reyes E (2003) International Union of Pharmacology. XL. Compendium of voltage-gated ion channels: calcium channels. *Pharmacol Rev* 55:579–81.
- Chan CS, Guzman JN, Ilijic E, Mercer JN, Rick C, Tkatch T, Meredith GE, Surmeier DJ (2007) ‘Rejuvenation’ protects neurons in mouse models of Parkinson’s disease. *Nature* 447:1081–6.
- Chieng B, Bekkers JM (1999) GABA(B), opioid and alpha2 receptor inhibition of calcium channels in acutely-dissociated locus coeruleus neurones. *Br J Pharmacol* 127:1533–8.
- Christie MJ, Williams JT, North RA (1989) Electrical coupling synchronizes subthreshold activity in locus coeruleus neurons in vitro from neonatal rats. *J Neurosci* 9:3584–9.

- Collingridge GL, James TA, MacLeod NK (1979) Neurochemical and electrophysiological evidence for a projection from the locus coeruleus to the substantia nigra. *J Physiol* 290:44.
- de Lau LML, Breteler MMB (2006) Epidemiology of Parkinson's disease. *Lancet Neurology* 5:525–35.
- de Oliveira RB, Howlett MCH, Gravina FS, Imtiaz MS, Callister RJ, Brichta aM, van Helden DF (2010) Pacemaker currents in mouse locus coeruleus neurons. *Neuroscience* 170:166–77.
- Ennis M, Aston-Jones G (1989) GABA-mediated inhibition of locus coeruleus from the dorsomedial rostral medulla. *J Neurosci* 9:2973–81.
- Fasano A, Daniele A, Albanese A (2012) Treatment of motor and non-motor features of Parkinson's disease with deep brain stimulation. *Lancet Neurology* 11:429–42.
- Fernandes P, Regala J, Correia F, Gonçalves-Ferreira aJ (2012) The human locus coeruleus 3-D stereotactic anatomy. *Surg Radiol Anat* 34:879–885.
- Foote SL, Aston-Jones G, Bloom FE (1980) Impulse activity of locus coeruleus neurons in awake rats and monkeys is a function of sensory stimulation and arousal. *Proc Natl Acad Sci USA* 77:3033–7.
- German DC, Manaye KF, White CL, Woodward DJ, McIntire DD, Smith WK, Kalaria RN, Mann DM (1992) Disease-specific patterns of locus coeruleus cell loss. *Ann Neurol* 32:667–76.
- Gesi M, Soldani P, Giorgi FS, Santinami A, Bonaccorsi I, Fornai F (2000) The role of the locus coeruleus in the development of Parkinson's disease. *Neurosci Biobehav Rev* 24:655–68.
- Guzman JN, Sánchez-Padilla J, Chan CS, Surmeier DJ (2009) Robust pacemaking in substantia nigra dopaminergic neurons. *J Neurosci* 29:11011–9.
- Guzman JN, Sanchez-Padilla J, Wokosin D, Kondapalli J, Ilijic E, Schumacker PT, Surmeier DJ (2010) Oxidant stress evoked by pacemaking in dopaminergic neurons is attenuated by DJ-1. *Nature* 468:696–700.

- Ilijic E, Guzman JN, Surmeier DJ (2011) The L-type channel antagonist isradipine is neuroprotective in a mouse model of Parkinson's disease. *Neurobiol Dis* 43:364–71.
- Ishimatsu M, Williams JT (1996) Synchronous activity in locus coeruleus results from dendritic interactions in pericoerulear regions. *J Neurosci* 16:5196–204.
- Jones BE, Moore RY (1977) Ascending projections of the locus coeruleus in the rat. II. Autoradiographic study. *Brain Research* 127:23–53.
- Katsuki H, Takenaka C, Kume T, Kaneko S, Akaike A (2001) Requirement of neural activity for the maintenance of dopaminergic neurons in rat midbrain slice cultures. *Neurosci Lett* 300:166–70.
- Kilbourn MR, Sherman P, Abbott LC (1998) Reduced MPTP neurotoxicity in striatum of the mutant mouse tottering. *Synapse* 30:205–10.
- Koschak a, Reimer D, Huber I, Grabner M, Glossmann H, Engel J, Striessnig J (2001)  $\alpha$ 1D (Cav1.3) subunits can form l-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels activating at negative voltages. *J Biol Chem* 276:22100–6.
- Koyama S, Jin YH, Akaike N (1999) ATP-sensitive and  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^{+}$  channel activities in the rat locus coeruleus neurons during metabolic inhibition. *Brain Research* 828:189–92.
- Kumar KR, Djarmati-Westenberger A, Grünewald A (2011) Genetics of Parkinson's disease. *Semin Neurol* 31:433–40.
- Lacinová L (2005) Voltage-dependent calcium channels. *Gen Physiol Biophys* 24 Suppl 1:1–78.
- Lee JH, Daud aN, Cribbs LL, Lacerda aE, Pereverzev A, Klöckner U, Schneider T, Perez-Reyes E (1999) Cloning and expression of a novel member of the low voltage-activated T-type calcium channel family. *J Neurosci* 19:1912–21.
- Lipscombe D, Helton TD, Xu W (2004) L-type calcium channels: the low down. *J Neurophysiol* 92:2633–41.

- Marien M, Briley M, Colpaert F (1993) Noradrenaline depletion exacerbates MPTP-induced striatal dopamine loss in mice. *Eur J Pharmacol* 236:487–9.
- Marras C, Gruneir A, Rochon P, Wang X, Anderson G, Brotchie J, Bell CM, Fox S, Austin PC (2012) Dihydropyridine calcium channel blockers and the progression of parkinsonism. *Ann Neurol* 71:362–9.
- Mavridis M, Degryse AD, Lategan AJ, Marien MR, Colpaert FC (1991) Effects of locus coeruleus lesions on parkinsonian signs, striatal dopamine and substantia nigra cell loss after 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine in monkeys: a possible role for the locus coeruleus in the progression of Parkinson's disease. *Neuroscience* 41:507–23.
- McRory JE, Hamid J, Doering CJ, Garcia E, Parker R, Hamming K, Chen L, Hildebrand M, Beedle AM, Feldcamp L, Zamponi GW, Snutch TP (2004) The CACNA1F gene encodes an L-type calcium channel with unique biophysical properties and tissue distribution. *J Neurosci* 24:1707–18.
- Mercuri NB, Bonci A, Calabresi P, Stratta F, Stefani A, Bernardi G (1994) Effects of dihydropyridine calcium antagonists on rat midbrain dopaminergic neurones. *Br J Pharmacol* 113:831–8.
- Michel PP, Alvarez-Fischer D, Guerreiro S, Hild A, Hartmann A, Hirsch EC (2007) Role of activity-dependent mechanisms in the control of dopaminergic neuron survival. *J Neurochem* 101:289–97.
- Monteil a, Chemin J, Bourinet E, Mennessier G, Lory P, Nargeot J (2000) Molecular and functional properties of the human alpha(1G) subunit that forms T-type calcium channels. *J Biol Chem* 275:6090–100.
- Murai Y, Ishibashi H, Koyama S, Akaike N (1997) Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> currents in rat locus coeruleus neurons induced by experimental ischemia, anoxia, and hypoglycemia. *J Neurophysiol* 78:2674–81.
- Naundorf B, Wolf F, Volgushev M (2006) Unique features of action potential initiation in cortical neurons. *Nature* 440:1060–3.

- Pasternak B, Svanström H, Nielsen NM, Fugger L, Melbye M, Hviid A (2012) Use of calcium channel blockers and Parkinson's disease. *Am J Epidemiol* 175:627–35.
- Peyron C, Tighe DK, van den Pol aN, de Lecea L, Heller HC, Sutcliffe JG, Kilduff TS (1998) Neurons containing hypocretin (orexin) project to multiple neuronal systems. *J Neurosci* 18:9996–10015.
- Platzer J, Engel J, Schrott-Fischer a, Stephan K, Bova S, Chen H, Zheng H, Striessnig J (2000) Congenital deafness and sinoatrial node dysfunction in mice lacking class D L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels. *Cell* 102:89–97.
- Rinvik, E. and Hammond, C. and Deniau, J. M. and Feger J (1979) Afferent connections to the subthalamic nucleus in the monkey and the cat studied with the HRP technique In Poirier LJ, Sourkes TL B, PJ, editors, *The extrapyramidal system and its disorders*, pp. 53–70. Raven Press, New York.
- Ritz B, Rhodes SL, Qian L, Schernhammer E, Olsen JrH, Friis Sr (2010) L-type calcium channel blockers and Parkinson disease in Denmark. *Ann Neurol* 67:600–6.
- Rodnitzky RL (1999) Can calcium antagonists provide a neuroprotective effect in Parkinson's disease? *Drugs* 57:845–9.
- Rommelfanger KS, Edwards GL, Freeman KG, Liles LC, Miller GW, Weinshenker D (2007) Norepinephrine loss produces more profound motor deficits than MPTP treatment in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:13804–9.
- Rommelfanger KS, Weinshenker D (2007) Norepinephrine: The redheaded stepchild of Parkinson's disease. *Biochem Pharmacol* 74:177–90.
- Salthun-Lassalle B, Hirsch EC, Wolfart J, Ruberg M, Michel PP (2004) Rescue of mesencephalic dopaminergic neurons in culture by low-level stimulation of voltage-gated sodium channels. *J Neurosci* 24:5922–30.
- Sara SJ (2009) The locus coeruleus and noradrenergic modulation of cognition. *Nat Rev Neurosci* 10:211–23.

- Shibata E, Sasaki M, Tohyama K, Otsuka K, Sakai A (2007) Reduced signal of locus ceruleus in depression in quantitative neuromelanin magnetic resonance imaging. *Neuroreport* 18:415–8.
- Shu Y, Duque A, Yu Y, Haider B, McCormick Da (2007) Properties of action-potential initiation in neocortical pyramidal cells: evidence from whole cell axon recordings. *J Neurophysiol* 97:746–60.
- Simuni T, Borushko E, Avram MJ, Miskevics S, Martel A, Zadikoff C, Videnovic A, Weaver FM, Williams K, Surmeier DJ (2010) Tolerability of isradipine in early Parkinson’s disease: a pilot dose escalation study. *Mov Disord* 25:2863–6.
- Srinivasan J, Schmidt WJ (2003) Potentiation of parkinsonian symptoms by depletion of locus coeruleus noradrenaline in 6-hydroxydopamine-induced partial degeneration of substantia nigra in rats. *Eur J Neurosci* 17:2586–92.
- Statistisches Bundesamt (2009) Bevölkerung Deutschlands bis 2060 - 12. koordinierte Bevölkerungsvorausberechnung, Begleitmaterial zur Pressekonferenz am 18. November 2009.
- Sukiasyan N, Hultborn H, Zhang M (2009) Distribution of calcium channel Ca(V)1.3 immunoreactivity in the rat spinal cord and brain stem. *Neuroscience* 159:217–35.
- Surmeier DJ, Guzman JN, Sanchez-Padilla J, Schumacker PT (2011) The role of calcium and mitochondrial oxidant stress in the loss of substantia nigra pars compacta dopaminergic neurons in Parkinson’s disease. *Neuroscience* 198:221–31.
- Surmeier DJ, Guzman JN, Sanchez-Padilla J (2010) Calcium, cellular aging, and selective neuronal vulnerability in Parkinson’s disease. *Cell Calcium* 47:175–82.
- Takahashi K, Kayama Y, Lin JS, Sakai K (2010) Locus coeruleus neuronal activity during the sleep-waking cycle in mice. *Neuroscience* 169:1115–26.



- Tanabe T, Takeshima H, Mikami A, Flockerzi V, Takahashi H, Kangawa K, Kojima M, Matsuo H, Hirose T, Numa S (1987) Primary structure of the receptor for calcium channel blockers from skeletal muscle. *Nature* 328:313–8.
- Ton TGN, Heckbert SR, Longstreth WT, Rossing MA, Kukull WA, Franklin GM, Swanson PD, Smith-Weller T, Checkoway H (2007) Calcium channel blockers and beta-blockers in relation to Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat D* 13:165–9.
- Touret M, Valatx JL, Jouvét M (1982) The locus coeruleus: a quantitative and genetic study in mice. *Brain Research* 250:353–7.
- Travagli RA, Dunwiddie TV, Williams JT (1995) Opioid inhibition in locus coeruleus. *J Neurophysiol* 74:518–28.
- Travagli Ra, Wessendorf M, Williams JT (1996) Dendritic arbor of locus coeruleus neurons contributes to opioid inhibition. *J Neurophysiol* 75:2029–35.
- van der Mark M, Brouwer M, Kromhout H, Nijssen P, Huss A, Vermeulen R (2012) Is pesticide use related to Parkinson disease? Some clues to heterogeneity in study results. *Environ Health Persp* 120:340–7.
- Williams JT, Marshall KC (1987) Membrane properties and adrenergic responses in locus coeruleus neurons of young rats. *J Neurosci* 7:3687–94.
- Williams JT, North Ra, Shefner Sa, Nishi S, Egan TM (1984) Membrane properties of rat locus coeruleus neurones. *Neuroscience* 13:137–56.
- Williams ME, Washburn MS, Hans M, Urrutia A, Brust PF, Prodanovich P, Harpold MM, Stauderman Ka (1999) Structure and functional characterization of a novel human low-voltage activated calcium channel. *J Neurochem* 72:791–9.
- Wolf M, Eberhart A, Glossmann H, Striessnig J, Grigorieff N (2003) Visualization of the Domain Structure of an L-type Ca<sup>2+</sup> Channel Using Electron Cryo-microscopy. *J Mol Biol* 332:171–182.

Xu W, Lipscombe D (2001) Neuronal Ca(V)1.3alpha(1) L-type channels activate at relatively hyperpolarized membrane potentials and are incompletely inhibited by dihydropyridines. *J Neurosci* 21:5944–51.

Yung WH, Häusser MA, Jack JJ (1991) Electrophysiology of dopaminergic and non-dopaminergic neurones of the guinea-pig substantia nigra pars compacta in vitro. *J Physiol* 436:643–67.

Zarow C, Lyness SA, Mortimer JA, Chui HC (2003) Neuronal loss is greater in the locus coeruleus than nucleus basalis and substantia nigra in Alzheimer and Parkinson diseases. *Arch Neurol* 60:337–41.

Zhang X, Cui N, Wu Z, Su J, Tadepalli JS, Sekizar S, Jiang C (2010) Intrinsic membrane properties of locus coeruleus neurons in Mecp2-null mice. *Am J Physiol Cell Ph* 298:C635–46.